

**Die Serin/Threonin Kinase Prp4 und die SR Proteine
sind Teil eines Mechanismus,
der in *Schizosaccharomyces pombe*
das Herausspleißen von Introns mit schwachen Spleißstellen
sicherstellt und koordiniert**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Nicole Andrée-Busch
aus Braunschweig

1. Referent: Professor Dr. Norbert F. Käufer
2. Referent: Professor Dr. André Fleißner
3. Referentin: Professorin Dr. Heike Krebber
eingereicht am: 18.03.2019
mündliche Prüfung (Disputation) am: 05.06.2019

Druckjahr 2019

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen:

Eckert, D., Andrée, N., Razanau, A., Zock-Emmenthal, S., Lützelberger, M., Plath, S., Schmidt, H., Guerra-Moreno, A., Cozzuto, L., Ayté, J., Käufer, N.F. (2016). Prp4 Kinase Grants the License to Splice: Control of Weak Splice Sites during Spliceosome Activation. PLoS Genetics 12(1): e1005768. doi:10.1371/journal.pgen.1005768

Andrée, N., Eckert, D., Käufer, N.F. (2016). Prp4 kinase as part of a safeguarding mechanism during intron recognition in fungi. Endocytobiosis and Cell Research 27: 27-38

Andrée-Busch, N., Eckert, D., Zock-Emmenthal, S., Käufer, N.F. (2018). Safeguarding of pre-mRNA splicing by Prp4 kinase is based on formation of transient structures. Trends in Cell & Molecular Biology 13

Posterbeiträge:

Andrée, N., Eckert, D., Zock-Emmenthal, S., Ayté, J., Käufer, N.F.: Prp4 kinase – an agent of quality control during spliceosome activation. (Poster) Annual Conference of the German Genetics Society (GfG)-Genetics, Kiel (2015)

Andrée, N., Eckert, D., Zock-Emmenthal, S., Johnson, J.L., Cantley, L.C., Ayté, J., Käufer, N.F.: Prp4 kinase – part of a safeguarding process during pre-mRNA splicing. (Poster) 9th International Fission Yeast Meeting, Banff (2017)

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
I Einleitung.....	2
1 Die Spalthefe <i>Schizosaccharomyces pombe</i> als Modellorganismus	2
2 Prä-mRNA Spleißen	3
2.1 Die Spleißreaktion.....	3
2.2 Herausforderungen bei der Intronerkennung	7
3 SR Proteine – Helfer bei der Intronerkennung.....	8
3.1 Die SR Proteine, spSrp1 und spSrp2, in <i>S. pombe</i>	10
3.2 Cis-regulatorische Elemente in Exons und Introns.....	12
4 An der Intronerkennung beteiligte Kinasen.....	13
4.1 Die essentielle spPrp4 Kinase und ihre Funktion während der Intronerkennung	14
4.2 Die zwei nicht-essentiellen Kinasen spDsk1 und spLkh1	15
4.3 Der Zusammenhang zwischen den Kinasen und den SR Proteinen in <i>S. pombe</i>	16
5 Fragestellungen und Ziele dieser Arbeit	17
II Ergebnisse.....	18
1 Die Intronerkennung erfolgt in <i>S. pombe</i> zuerst durch Anlagerung des U1 snRNPs an der 5'-Exon/5'-SS	18
2 Die Kinasen Prp4, Dsk1 und Lkh1 phosphorylieren SR Proteine und spleißosomale Proteine des U1 snRNPs	23
2.1 Prp4 Kinase phosphoryliert U1-70K, Bpb1, Srp2, und Rsd1 <i>in vitro</i> , während Dsk1 und Lkh1 viele Substrate phosphorylieren	24
2.2 Die Kinasen Prp4, Dsk1 und Lkh1 haben charakteristische Substrat-Sequenzen	28
3 Die Deletion von <i>srp1</i> und gleichzeitige Repression von <i>srp2</i> beeinflusst das Zellwachstum und führt zu einer Veränderung der Prp4 Kinase-Abhängigkeit im Spleißprozess	30
3.1 Die Prp4 Kinase-abhängigen Introns werden bei Deletion von <i>srp1</i> und gleichzeitiger Repression von <i>srp2</i> Prp4 Kinase-unabhängig gespleißt	31
3.2 Die RNA-Sequenzierung bestätigt, dass das Fehlen der beiden SR Proteine bei fast allen Introns zu Prp4 Kinase-Unabhängigkeit führt	36
4 Die gleichzeitige Deletion der Kinasen Dsk1 und Lkh1 beeinflusst das Zellwachstum und führt zu einer Veränderung der Prp4 Kinase-Abhängigkeit im Spleißprozess	40
4.1 Die gleichzeitige Deletion der Kinase Dsk1 und Lkh1 führt bei den Prp4 Kinase-abhängigen Introns zu Prp4 Kinase-Unabhängigkeit	41
4.2 Das SR Protein Srp2 ist auch bei Deletion von <i>dsk1</i> und <i>lkh1</i> im Kern lokalisiert	45
5 Mutationen im Exon1 zweier Reportergene beeinflussen die Erkennung und Prp4 Kinase-Abhängigkeit der Introns	48
5.1 Konstruktion des <i>res1</i> -Reportergens	49
5.2 Das Intron des Allels <i>res1</i> -WT.K zeigt auch im <i>leu1</i> -Lokus ein Prp4 Kinase-abhängiges Spleißverhalten	50
5.3 Mutationen in Exon1 oberhalb der AAG/5'-SS des Prp4-abhängigen <i>res1</i> -Reportergens beeinflussen die Erkennung und Prp4 Kinase-Abhängigkeit des Introns	51
5.3.1 Mutationen in den letzten 10 Nukleotiden im Exon1 haben Auswirkungen auf die Erkennung und Prp4 Kinase-Abhängigkeit des Introns.....	52

5.3.2	Mutationen in den letzten 20 Nukleotiden im Exon1 haben einen Einfluss auf die Prp4 Kinase-Abhängigkeit des Introns	53
5.3.3	Mutationen in den Bereichen Mut3, Mut4 und Mut5 verändern die Prp4 Kinase-Abhängigkeit des Introns nicht	55
5.4	Mutationen in Exon1 oberhalb der AAG/5'-SS des Prp4 Kinase-unabhängigen <i>res1⁻¹</i> -Reportergens haben keine Auswirkung auf das Spleißverhalten des Introns.....	56
5.4.1	Zwei zusätzliche Basenpaarungen an Position +3 und +4 in der 5'-SS verwandeln das Intron von <i>res1⁻¹-WT.K</i> in ein Prp4-unabhängiges Intron	56
5.4.2	Mutationen in Exon1 des Prp4-unabhängigen Reportergens <i>res1⁻¹</i> beeinflussen die Erkennung und Prp4 Kinase-Unabhängigkeit des Introns nicht	57
5.5	Bestimmte Nukleotid-Kombinationen in Bereich Mut1 oberhalb der AAG/5'-SS des Prp4-abhängigen <i>res1⁻¹</i> -Reportergens verändern die Prp4 Kinase-Abhängigkeit.....	60
5.5.1	Kombinationen von As und Us in Mut1 resultieren in einem Prp4 Kinase-unabhängig gespleißten Intron.....	60
5.5.2	Kombinationen von As und Cs in Mut1 können wieder zu einem Prp4 Kinase-abhängigen Intron führen.....	61
5.5.3	Die Kombination von As und einem G in Mut1 ist ausreichend, damit das Intron wieder Prp4 Kinase-abhängig gespleißt wird.....	63
5.5.4	Mutationen an den Positionen -12 und -13 in dem Bereich Mut1 haben kaum Konsequenzen für die Prp4 Kinase-Abhängigkeit.....	64
5.5.5	Position -4 ist entscheidend, ob ein Intron Prp4-unabhängig oder Prp4-abhängig gespleißt wird	65
5.6	Konstruktion des <i>trs402⁻¹</i> -Reportergens	68
5.7	Das Intron des Allels <i>trs402⁻¹-WT.N</i> zeigt auch im <i>leu1</i> -Lokus ein Prp4 Kinase-unabhängiges Spleißverhalten.....	69
5.8	Mutationen in Exon1 oberhalb der AGG/5'-SS des Prp4 Kinase-unabhängigen <i>trs402⁻¹-WT.N</i> -Reportergens verändern das Spleißverhalten des Introns nicht.....	70
5.8.1	Mutationen in Exon1 des Prp4-unabhängigen Reportergens <i>trs402⁻¹-WT.N</i> beeinflussen die Erkennung und Prp4 Kinase-Unabhängigkeit des Introns nicht	71
5.9	Mutationen in Exon1 oberhalb der AGG/5'-SS des Prp4-abhängigen Reportergens <i>trs402⁻¹-1.N</i> beeinflussen die Erkennung und Prp4 Kinase-Abhängigkeit des Introns	72
5.9.1	Eine fehlende Basenpaarung an Position +3 in der 5'-SS verwandelt das Intron von <i>trs402⁻¹-WT.N</i> in ein Prp4-abhängiges Intron	72
5.9.2	Mutationen in den letzten 10 Nukleotiden im Exon1 haben Auswirkungen auf die Erkennung und Prp4 Kinase-Abhängigkeit des Introns.....	73
III	Diskussion.....	76
1	Evolution der spleißosomalen Introns	76
2	Proteine, die im ersten Schritt der Intronerkennung <i>in vivo</i> in <i>S. pombe</i> involviert sind, konnten als <i>in vitro</i> Substrate der Prp4 Kinase identifiziert werden	79
3	Bei Introns mit schwachen X ₃ X ₂ X ₁ /5'-SSs hat die Sequenz im 5'-Exon einen Einfluss auf die Erkennung und Prp4 Kinase-Abhängigkeit des Introns	83
4	Die SR Proteine, Srp1 und Srp2, könnten zusammen mit den Kinasen Dsk1 und Lkh1 an dem Prp4 Kinase-abhängigen Mechanismus während der Intronerkennung beteiligt sein.....	86
5	Spleißen als Teil der Genexpression in <i>S. pombe</i>	91
6	Ausblick.....	92
IV	Material und Methoden	93
1	Material	93

1.1	Chemikalien.....	93
1.2	Geräte, Zentrifugen und Rotoren.....	96
2	Stämme und Kulturbedingungen.....	97
2.1	Stämme und Medien für <i>S. pombe</i>	97
2.2	Stämme und Medien für <i>S. cerevisiae</i>	101
2.3	Stämme und Medien für <i>Escherichia coli</i>	101
3	Vektoren und Konstrukte	102
3.1	pGEX-6P-1 Vektor	103
3.2	Konstruktion und Mutagenese des <i>res1</i> ⁻ - und <i>trs402</i> ⁻ -Reportergens.....	104
4	Molekularbiologische Methoden.....	109
4.1	Lösungen molekularbiologische Methoden.....	109
4.2	Herstellung kompetenter Zellen.....	109
4.3	Transformation in <i>E. coli</i>	110
4.4	Plasmid-Isolierung aus <i>E. coli</i>	110
4.4.1	Plasmid Mini-Präparation aus <i>E. coli</i> nach Gaterman et al	110
4.5	Reinigung von DNA	111
4.6	Photometrische Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren	111
4.7	Restriktionsverdau	111
4.8	Ligation.....	111
4.9	Agarose-Gelelektrophorese	111
4.10	Extraktion aus Agarose-Gelen.....	112
4.11	Sequenzierung.....	112
4.12	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	112
4.13	<i>Pfu</i> -Mutagenese	112
4.14	<i>In vitro</i> Mutagenese nach Kunkel (1985)	113
4.15	Yeast Recombinational Cloning (YRC).....	114
4.16	Plasmid-Isolierung aus <i>S. cerevisiae</i>	118
5	Biochemische Methoden	120
5.1	Lösungen biochemische Methoden	120
5.2	Proteinüberexpression	121
5.3	Proteinaufreinigung über den GST-Tag.....	121
5.4	<i>In vitro</i> Kinaseassay	122
5.5	Synthetische Peptidbanken.....	122
6	Methoden zur Untersuchung von <i>S. pombe</i>	123
6.1	Kreuzung von <i>S. pombe</i> Stämmen.....	123
6.2	Transformation in <i>S. pombe</i>	123
6.3	Kolonie-PCR <i>S. pombe</i>	124
6.4	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>S. pombe</i>	125
6.5	Der ATP-analoge Inhibitor 1NM-PP1.....	125
6.6	RNA Isolierung aus <i>S. pombe</i> nach Nischt et al. (1986).....	126
6.7	Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)	126

Inhaltsverzeichnis

6.7.1	DNaseI-Verdau	126
6.7.2	RT-PCR Bedingungen und Primer.....	126
6.8	RNA-Sequenzierung	128
6.9	RNA-Immunopräzipitation (RIP)	128
6.10	RT-qPCR.....	130
6.11	Fluoreszenzmikroskopie	132
V	Referenzen.....	133
VI	Anhang	143
1	Rohdaten zu den Ergebnissen der RIP	143
2	Im Kinaseassay wurde das jeweilige mögliche Substrat mit der Kinase im Verhältnis 2.5 zu 1 eingesetzt und der Film wurde anschließend für unterschiedliche Dauer auf dem Gel exponiert ..	147
3	Die veränderte Transkriptionsrate des Gens <i>srp2</i> durch den <i>nmt81</i> Promotor hat weder einen Einfluss auf die Wachstumsrate noch auf die Prp4-Abhängigkeit	150
4	Mutationen in den Bereichen Mut3, Mut4 und Mut5 des Prp4-abhängigen <i>res1</i> -Reportergens haben keinen Einfluss auf die Prp4-Abhängigkeit	152
	Abkürzungsverzeichnis	156
	Danksagung	158

Zusammenfassung

Das prä-mRNA Spleißen ist als Prozessierungsschritt der post-transkriptionalen Modifikation von RNA Transkripten ein wichtiger Teil der eukaryotischen Genexpression. Dabei werden aus der prä-mRNA, die in Exons und Introns unterteilt ist, die Introns herausgespleißt. Die Exons werden miteinander verknüpft bevor das Transkript anschließend als reife mRNA aus dem Zellkern in das Zytoplasma exportiert und für die Translation verwendet wird. Diese Reaktion wird durch das Spleißosom katalysiert. Dieses erkennt anhand der 5'-Exon/5'-Spleißstelle, der Verzweigungssequenz und der 3'-Spleißstelle den Anfang und das Ende des Introns.

Es ist bekannt, dass die Aktivität der Serin/Threonin Kinase Prp4 in *Schizosaccharomyces pombe* für die Erkennung und das Herausspleißen von Introns mit schwachen Spleißstellen benötigt wird. Diese Introns werden als Prp4 Kinase-abhängige Introns bezeichnet. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Intronerkennung zuerst am 5'-Ende des Introns durch Anlagerung des U1 snRNPs erfolgt. Die Funktion der Prp4 Kinase sollte bei diesem essentiellen Schritt der Intronerkennung weiter aufgeklärt werden. Deswegen wurden zunächst neue *in vitro* Substrate der Prp4 Kinase identifiziert. Dazu zählen das Protein U1-70K des U1 snRNPs, das Protein Bpb1, das SR Protein Srp2 und das SR-ähnliche Protein Rsd1. SR Proteine sind dafür bekannt als *trans*-agierende Spleißfaktoren mit Komponenten des Spleißosoms zu interagieren und zur Erkennung von Introns beizutragen. Es wurde gezeigt, dass die Aktivität der Prp4 Kinase mit den SR Proteinen, Srp1 und Srp2, in Verbindung steht. Fehlen diese beiden Proteine in der Zelle, zeigt sowohl die Analyse einzelner Introns durch RT-PCR als auch eine Sequenzierung der Gesamt-RNA, dass nahezu alle Introns Prp4-unabhängig gespleißt werden. Die beiden nicht-essentiellen Kinasen, Dsk1 und Lkh1, sind auch an diesem Mechanismus beteiligt. Die Analyse einzelner Introns durch RT-PCR zeigt, dass eine Deletion dieser beiden Kinasen ebenfalls zu Prp4-Unabhängigkeit der Introns führt. Mutationsanalysen im 5'-Exon zweier Reportergene oberhalb der X₃X₂X₁/5'-SS zeigen, dass auch die Sequenz im Bereich des 5'-Exons eine Auswirkung auf die Erkennung und Prp4 Kinase-Abhängigkeit von Introns hat. Introns, die unabhängig von der Aktivität der Prp4 Kinase gespleißt werden, sind von Mutationen im Bereich des 5'-Exons nicht beeinflusst. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass die Prp4 Kinase zusammen mit den SR Proteine und den beiden nicht-essentiellen Kinasen, Dsk1 und Lkh1, das Herausspleißen von Introns mit schwachen Spleißstellen sicherstellt und koordiniert.

I Einleitung

1 Die Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* als Modellorganismus

Die Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* gehört genauso wie die Knosp- oder Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* zur Abteilung der Ascomyceten (Schlauchpilze). Diese sind nach ihren Fortpflanzungsstrukturen, den schlauchförmigen Asci, benannt. Die zylindrische, stäbchenförmige Spalthefe *S. pombe* wurde 1893 zum ersten Mal von Paul Lindner aus ostafrikanischem Hirsebieer isoliert. Der Name *Schizosaccharomyces* wurde eingeführt, um auszudrücken, dass dieser Organismus Eigenschaften wie Sporenbildung und Fermentation mit der Gattung *Saccharomyces* gemein hat, sich aber durch Spaltung (*Schizo*-) teilt (Lindner, 1893). Der Name *pombe* ist das Swahili Wort für Bier, für dessen Herstellung *S. pombe* verwendet wurde. Im Jahr 1950 wurden erstmalig genetische Untersuchungen mit *S. pombe* durch Urs Leupold durchgeführt (Leupold, 1950).

Beide Hefen sind einzellige Eukaryoten, deren Genom vollständig sequenziert ist (Goffeau et al., 1996; Wood et al., 2001; Wood et al., 2002). Sie sind im Labor leicht zu kultivieren, können haploid vermehrt und dadurch mit Hilfe etablierter molekularbiologischer Methoden genetisch leicht verändert werden. Außerdem weisen sie Gemeinsamkeiten in zellbiologischen Prozessen mit mehrzelligen Eukaryoten auf (Forsburg, 2005). Es wird davon ausgegangen, dass sich die beiden Hefen schon vor mehr als 1000 Millionen Jahren evolutionär auseinander entwickelt haben (Hedges, 2002). Deswegen weisen sie neben vielen Gemeinsamkeiten auch große Unterschiede bei einigen zellulären Prozessen auf. Dazu zählt zum Beispiel auch das prä-mRNA Spleißen (Aravind et al., 2000; Forsburg, 2005). Beide Hefen besitzen im Vergleich zu Mammalia eher kleine Introns. In *S. pombe* liegt die durchschnittliche Größe bei 83 bp und in *S. cerevisiae* bei 256 bp (Wood et al., 2002; Kupfer et al., 2004; Neuvéglise et al., 2011; Wood et al., 2012). Die Anzahl der Introns ist auch unterschiedlich. In *S. pombe* enthalten 44,6 % der Gene Introns, während *S. cerevisiae* zu den intronarmen Organismen zählt und nur etwa 4,5 % intronhaltige Gene besitzt (Schwartz et al., 2008). Außerdem hat sich gezeigt, dass eine Reihe von Proteinen, die im Spleißprozess von Bedeutung sind und auch in Mammalia vorkommen, zwar in *S. pombe* aber nicht in *S. cerevisiae* vorhanden sind (Aravind et al., 2000). Dazu gehören die Serin/Threonin Kinase spPrp4 (hsPRPF4B), die Serin/Arginin-reichen (SR) Proteine spSrp1 (hsSRSF2) und spSrp2 (hsSRSF4/5/6) und auch die SR-ähnlichen Proteine spUaf2 (hsU2AF1) und spRsd1 (hsRBM23/39) (Aravind et al., 2000; Käufer und Potashkin, 2000; Wood et al., 2001; Wood et al., 2002; Kuhn und Käufer, 2003; Plass et al., 2008). Aufgrund dessen wird *S. pombe* in dieser Arbeit als Modellorganismus genutzt, um das prä-mRNA Spleißen *in vivo* weiter zu untersuchen.

2 Prä-mRNA Spleißen

Das prä-mRNA Spleißen ist neben dem 5'-Capping und der 3'-Polyadenylierung ein Teil der Prozessierung von Transkripten in Eukaryoten, bevor diese als reife mRNA aus dem Zellkern in das Zytoplasma exportiert und für die Translation verwendet werden. Diese essentielle Reaktion wird durch das Spleißosom, ein Ribonukleoprotein-Komplex, katalysiert (Brody und Abelson, 1985). Dabei werden nicht-kodierenden Bereiche (Introns) in der prä-mRNA erkannt, herausgeschnitten und die kodierende Bereiche (Exons) miteinander verknüpft, so dass die reife mRNA entsteht (Berget et al., 1977; Chow et al., 1977).

2.1 Die Spleißreaktion

Als erstes muss das Spleißosom den Anfang und das Ende des Introns erkennen, um dieses fehlerfrei entfernen zu können. Dabei sind vier kurze Sequenzabschnitte wichtig, die die exakte Intronerkennung ermöglichen (Abbildung 1, A). Dazu zählen die Exon-Intron-Übergänge mit der 5'- und 3'-Spleißstelle (5'- bzw. 3'-SS), die den Anfang und das Ende eines Introns darstellt, sowie die Verzweigungssequenz (BS, engl. *branch sequence*), in der ein Adenosin zu finden ist, das den Verzweigungspunkt (BP, engl. *branch point*) bildet (Burge et al., 1999). Außerdem kann eine zusätzliche pyrimidinreiche Region zwischen dem BP und der 3'-SS vorhanden sein, die als Polypyrimidin-Trakt bezeichnet wird. Diese ist in vielen Metazoen sehr ausgeprägt, während sie in den meisten Pilzen nur sehr schwach oder gar nicht zu finden ist (Schwartz et al., 2008).

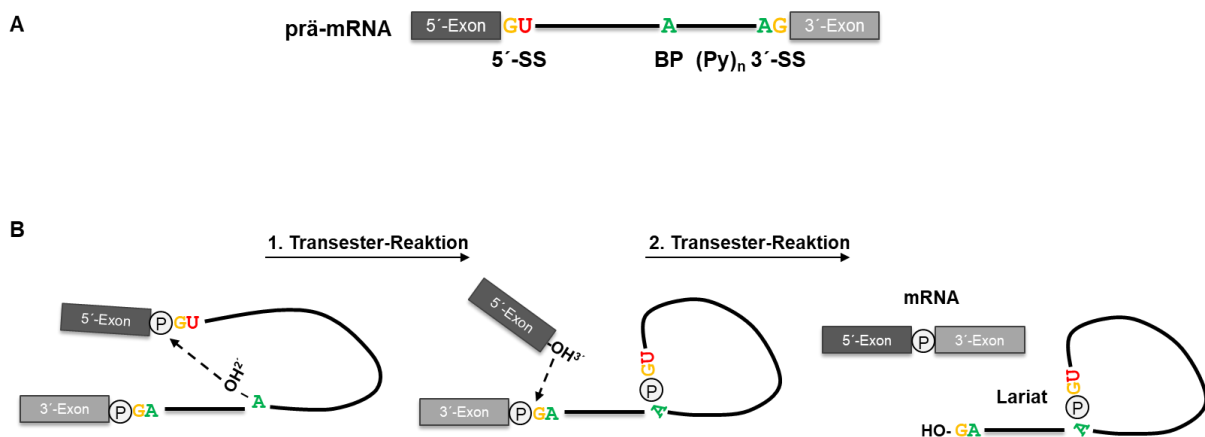


Abbildung 1 | Charakteristische Elemente eines Introns für die Intronerkennung und Spleißreaktion

(A) Schematische Darstellung einer prä-mRNA mit zwei Exons (Rechtecke), die durch ein Intron (Linie) getrennt sind. Die konservierten Nukleotide, wie das GU am Anfang des Introns, das Adenosin am BP und das AG am Ende des Introns sind farblich hervorgehoben. 5'-SS, 5'-Spleißstelle; BP, Verzweigungspunkt; (Py)_n, Pyrimidin-Trakt; 3'-SS, 3'-Spleißstelle. (B) Darstellung der zwei Transester-Reaktionen, bei denen das Intron herausgeschnitten und als Lariat freigesetzt wird. Konservierten Nukleotide sind farblich hervorgehoben. OH, Hydroxylgruppe; P, Phosphodiesterbindung. Modifiziert von Eckert (2015) in Anlehnung an Wahl et al. (2009).

I Einleitung

Während der Spleißreaktion finden zwei Transester-Reaktionen statt (Abbildung 1, B). Zuerst erfolgt ein nukleophiler Angriff der 2'-Hydroxylgruppe des BP-Adenosins an der Phosphodiesterbindung der 5'-SS, wodurch die Exon-Intron-Verbindung am 5'-Ende des Introns gespalten wird. Gleichzeitig entsteht eine neue 5'-2'-Phosphodiesterbindung am BP. Diese Struktur wird als Lariat-Struktur des Introns bezeichnet. Der zweite nukleophile Angriff erfolgt durch die 3'-Hydroxylgruppe des 5'-Exons an der Phosphodiesterbindung der 3'-SS. Dadurch werden die beiden Exons miteinander ligiert, sodass die reife mRNA entsteht, und das Intron wird als Lariat-Struktur frei gelassen (Burge et al., 1999).

Diese Reaktionen werden durch das Spleißosom katalysiert. Das Spleißosom besteht aus fünf kleinen Kernribonukleoprotein Partikeln (snRNPs, engl. *small nuclear ribonucleoprotein particles*): U1, U2, U4/U6 und U5. Jedes der fünf snRNPs besteht aus einer spezifischen kleinen Kern RNA (snRNA, engl. *small nuclear RNA*), sieben Sm-Proteinen (und LSm-Proteinen bei U6) sowie einer variablen Anzahl weiterer partikelspezifischer Proteine (Abbildung 2) (Jurica und Moore, 2003; Will und Lührmann, 2011).

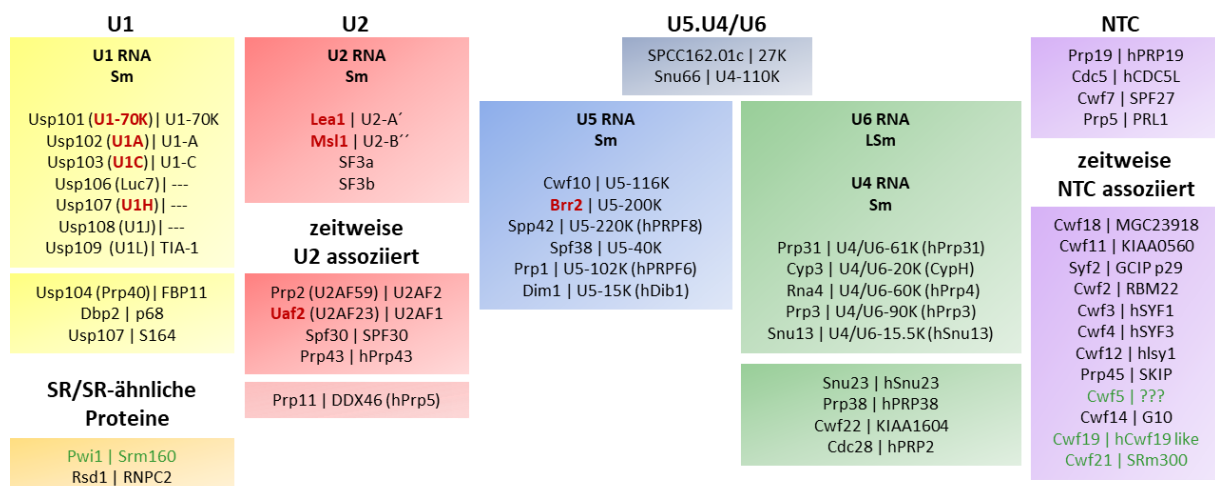


Abbildung 2 | Partikelspezifische Proteine eines prä-katalytischen Spleißosoms (B-Komplex) aus *S. pombe*

Die prä-katalytischen Spleißosomen wurden durch eine TAP-Aufreinigung isoliert (Lützelberger et al., 2010), die gebundenen Proteine massenspektroskopisch identifiziert und zugeordnet. Dabei wurden sowohl die Proteinennamen aus *S. pombe* (links, Bezeichnung nach Wood et al. (2012)) als auch aus *Homo sapiens* (rechts, Bezeichnung nach Deckert et al. (2006)) angegeben. Grüne Schrift, Proteine, die nicht an einem prä-katalytischen Spleißosom in HeLa-Zellen zu finden sind. Rote Schrift, Proteine mit denen in dieser Arbeit in der RIP gearbeitet wurde. Modifiziert von Eckert (2015).

Während in *S. cerevisiae* insgesamt ca. 90 Proteine mit dem Spleißosom assoziiert sind, sind es in Mammalia nahezu doppelt so viele Proteine (Deckert et al., 2006; Fabrizio et al., 2009). Dadurch wird in Mammalia reguliertes alternatives Spleißen ermöglicht, welches in Pilzen selten und in beiden Hefen während der vegetativen Vermehrung gar nicht auftritt (Ast, 2004; Grützmann et al., 2014; Irimia und Roy, 2014). Das bedeutet nicht, dass alternatives Spleißen in *S. pombe* überhaupt nicht vorkommt. Es wird aber auf Grund der

bisherigen Analysen davon ausgegangen, dass Transkripte, die noch Introns enthalten (*Intron Retention*) oder denen Exons fehlen (*Exon Skipping*), fehlerhaft gespleißte Transkripte sind, die anschließend aktiv degradiert werden (Bitton et al., 2015; Stepankiw et al., 2015).

Zusätzlich zu den fünf snRNPs sind auch nicht-snRNP Proteine am prä-mRNA Spleißen beteiligt. Dazu zählen neben dem essentiellen Proteinkomplex, der mit spPrp19 (scPrp19/hsPRPF19) assoziiert ist und als *NineTeen Complex* (NTC) bezeichnet wird, SR und SR-ähnlichen Proteine und die drei Kinasen spPrp4, spDsk1 und spLkh1 (Jurica und Moore, 2003; Will und Lührmann, 2011).

Gemäß dem klassischen Modell zur Assemblierung des Spleißosoms, das überwiegend auf *in vitro* Experimenten basiert, wird von einem schrittweisen Aufbau des Spleißosoms ausgegangen. Dieser ist in Abbildung 3 schematisch gezeigt (Rino und Carmo-Fonseca, 2009; Wahl et al., 2009). Zuerst erfolgt die Bindung des U1 snRNPs am Anfang des Introns durch Basenpaarung des 5'-Endes der U1 snRNA mit der 5'-SS (Zhuang und Weiner, 1986; Siliciano und Guthrie, 1988; Séraphin et al., 1988). Außerdem bindet das Protein spBpb1 (scMsl5/hsSF1) an die Sequenz um den BP und ein Heterodimer, bestehend aus spPrp2 (scMud2/hsU2AF2) und spUaf2 (hsU2AF1), an den Pyrimidin-Trakt und die 3'-SS (Berglund et al., 1997; Berglund et al., 1998; Wu et al., 1999). Zusammen bilden diese molekularen Interaktionen den E-Komplex und spielen eine entscheidende Rolle bei der Erkennung und Markierung der 5'- und 3'-SS des Introns. Danach erfolgt die Anlagerung des U2 snRNPs und somit die Basenpaarung der U2 snRNA mit der BS, wodurch spBpb1 vom BP verdrängt und ein prä-Spleißosom gebildet wird, das auch als A-Komplex bekannt ist (Parker et al., 1987; Wu und Manley, 1989). Anschließend wird das prä-katalytische Spleißosom, das auch als B-Komplex bezeichnet wird, durch die Anlagerung des Tri-snRNPs, bestehend aus U5 und U4/U6 basengepaart, sowie dem NTC vervollständigt (Görnemann et al., 2005; Tardiff und Rosbash, 2006; Will und Lührmann, 2011). Dieser an der prä-mRNA angelagerte Komplex ist, obwohl alle snRNPs vorhanden sind, immer noch katalytisch inaktiv. Durch mehrere Konformationsänderungen, die unter anderem dazu führen, dass die snRNPs U1 und U4 und die Proteine spPrp2 (scMud2/hsU2AF2) und spUaf2 (hsU2AF1) das Spleißosom verlassen, wird das Spleißosom aktiviert. Dieser Komplex wird als B^{akt}-Komplex bezeichnet (Jurica und Moore, 2003; Wahl et al., 2009). Was genau zur Aktivierung des Spleißosoms führt, ist bis heute nicht bekannt. Nun findet die erste Transester-Reaktion statt, wodurch das Spleißosom in den C-Komplex übergeht. Erneute Konformationsänderungen führen dazu, dass die zweite Transester-Reaktion stattfinden kann (Konarska et al., 2006). Anschließend wird das post-katalytische Spleißosom abgebaut und die Spleißreaktion ist abgeschlossen (Wahl et al., 2009).

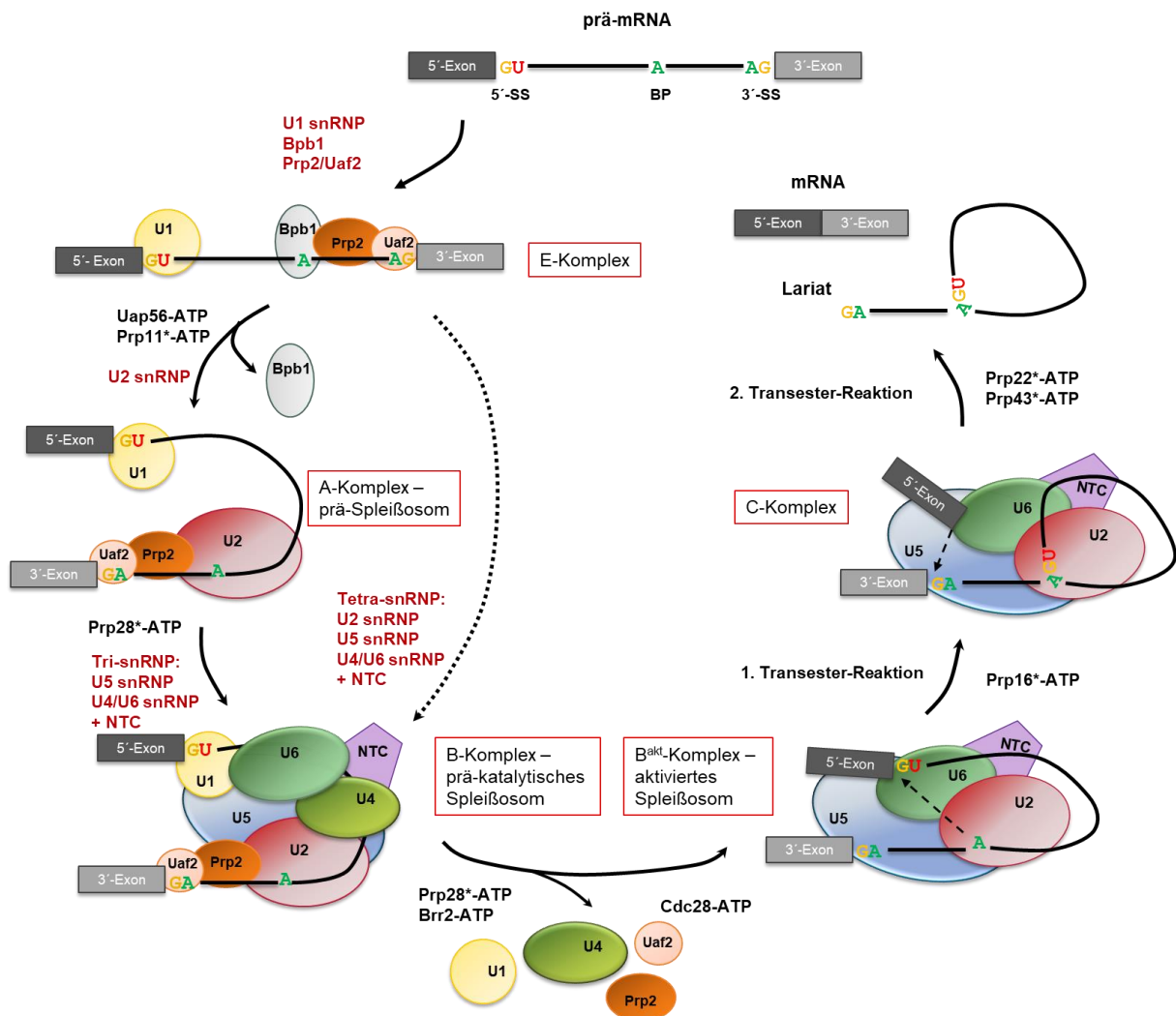


Abbildung 3| Modell zur Assemblierung des Spleißosoms

Schrittweiser Aufbau des Spleißosoms an einer prä-mRNA. Nach häufigen Veränderungen von Konformation und Zusammensetzung des Spleißosoms kann das Intron als Lariat entfernt und die beiden Exons miteinander verknüpft werden. Die fünf snRNPs sind mit U1, U2, U4, U5 und U6 beschriftet und als Ellipsen dargestellt. Nicht-snRNP Proteine (Bpb1, Prp2 und Uaf2) sowie der NTC sind gezeigt. Acht DexD/H RNA-Helikasen sind am Spleißprozess beteiligt und an ihrem jeweiligen Wirkungsort gezeigt. Die Helikasen, für die eine Korrekturlese-Aktivität gezeigt werden konnte, sind mit einem „*“ markiert (Cordin und Beggs, 2013). Die Namen der Proteine entsprechen der *S. pombe* Nomenklatur (Wood et al., 2012). 5'-SS, 5'Spleißstelle; 3' SS, 3'-Spleißstelle und BP, Verzweigungspunkt. Modifiziert von Eckert (2015) in Anlehnung an Wahl et al. (2009).

In vivo scheint es allerdings auch möglich zu sein, dass sich die snRNPs, anders als bei einem schrittweisen Aufbau, vorher als prä-katalytisches Spleißosom zusammenlagern und dann an die prä-mRNA binden (Chen et al., 2007; Kotzer-Nevo et al., 2014). Es konnte aus verschiedenen Organismen sowohl ein Tetra-snRNP, bestehend aus U2.U5.U4/U6, (Konarska und Sharp, 1988; Raghunathan und Guthrie, 1998; Gottschalk et al., 1999; Carnahan et al., 2005), als auch ein funktionsfähiger Penta-snRNP, bestehend aus U1.U2.U5.U4/U6 (Stevens et al., 2002), isoliert werden.

Am Spleißprozess sind neben Proteinkinasen, Phosphatasen und GTPasen auch acht konservierte RNA-Helikasen beteiligt, die sowohl RNA-RNA- als auch RNA-Protein-Interaktionen kontrollieren und verändern (Staley und Guthrie, 1998; Wahl et al., 2009; Cordin und Beggs, 2013). Dadurch werden die Konformationsänderungen katalysiert, die sowohl für den Auf- sowie Abbau des Spleißosoms als auch die Spleißreaktion notwendig sind. Für fünf der acht RNA-Helikasen konnte eine Korrekturlese-Aktivität gezeigt werden (Abbildung 3). Diese gewährleistet, dass nur prä-mRNAs den Spleißprozess durchlaufen, die korrekte RNA-RNA- und RNA-Protein-Interaktionen eingehen (Cordin und Beggs, 2013).

2.2 Herausforderungen bei der Intronerkennung

Wie bereits erwähnt sind RNA-RNA-Interaktionen für die Intronerkennung essentiell. Als erstes erkennt der U1 snRNP den Anfang des Introns, indem das 5'-Ende der U1 snRNA komplementäre Basenpaarungen mit der 5'-Exon/5'-SS eingeht. Im optimalen Fall können die letzten drei Basen im 5'-Exon und die ersten sechs Basen im Intron, die als 5'-SS bezeichnet werden, mit neun Basen am 5'-Ende der U1 snRNA interagieren (Zhuang und Weiner, 1986; Siliciano und Guthrie, 1988; Séraphin et al., 1988). Die zweite RNA-RNA-Interaktion, die eingegangen wird, ist die zwischen der U2 snRNA und der BS bei Anlagerung des U2 snRNPs. Im optimalen Fall können vier komplementäre Basenpaarungen zwischen der U2 snRNA und der BS eingegangen werden, wobei das BP-Adenosin ausgestülpt wird (Abbildung 4 A) (Parker et al., 1987; Wu und Manley, 1989). Die Stabilität dieser Interaktion wird durch Korrekturlese-Aktivität durch die RNA-Helikase spPrp11 überprüft. Diese RNA-Helikase stellt sicher, dass die U2 snRNA richtig an die BS angelagert ist und katalysiert anschließend die Konformationsänderung, die für die weitere Spleißreaktion notwendig ist (Xu und Query, 2007) (Abbildung 3).

Viele 5'-Exon/5'-SSs und BSs der Introns sind allerdings nicht konserviert und somit auch nicht in allen Positionen komplementär zu der jeweiligen snRNA (Abbildung 4 B). Hinzu kommt, dass die letzten drei Nukleotide des 5'-Exons Teil der kodierenden Sequenz des Gens und somit variabel sind (Schwartz et al., 2008; Roy und Irimia, 2009). Das führt dazu, dass häufig nicht alle potentiellen Basenpaarungen zwischen der 5'-Exon/5'-SSs und U1 snRNA sowie der BS und der U2 snRNA eingegangen werden können und somit schwache SSs bzw. BSs vorliegen. Es hat sich gezeigt, dass die Anzahl der Introns mit der Konservierung der SSs und BSs korreliert. Intronarme Organismen ($< 0,2$ Introns/Gen), zu denen die Hemiascomyceten wie *S. cerevisiae* gehören, zeigen eine starke Konservierung der 5'-SSs und auch der BSs. Intronreiche Organismen, wie *S. pombe* und *H. sapiens*, besitzen hingegen viele Introns, bei denen die Sequenzen der SSs und BSs von der optimalen komplementären Sequenz zur entsprechenden snRNA abweichen (Bon et al., 2003; Irimia et al., 2007; Gao et al., 2008; Irimia und Roy, 2008; Schwartz et al., 2008; Irimia

I Einleitung

et al., 2009). Diese schwachen SSs und BSs erfordern die Beteiligung weiterer Proteine während der Intronerkennung, wozu in *S. pombe* die spPrp4 Kinase zählt (Eckert et al., 2016; Andrée-Busch et al., 2018).

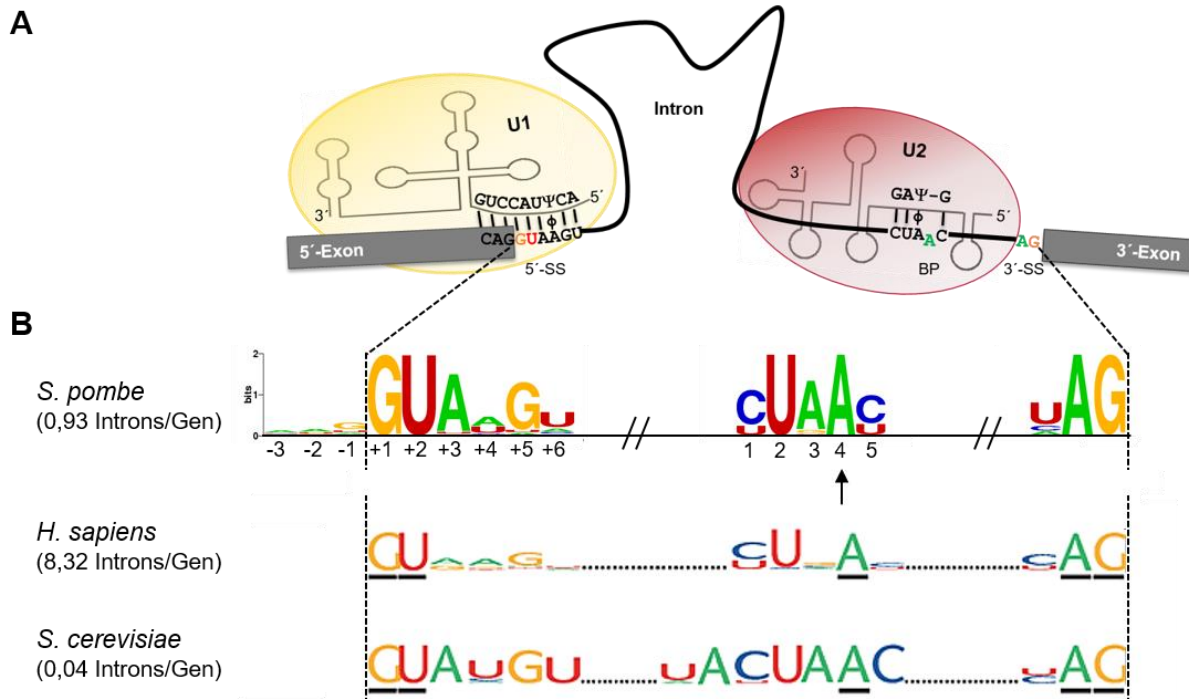


Abbildung 4| Intronerkennung durch RNA-RNA-Interaktionen

(A) Bindung der U1 und U2 snRNA an die prä-mRNA. Durch die komplementären Basenpaarungen erfolgt die Erkennung des Intronanfangs und der BS. Konservierte Basen sind farblich hervorgehoben. |, Watson-Crick-Basenpaarung; Ψ, Pseudouridin; φ, Ψ-A Paarung (B) Evolutionäre Konservierung der Spleißstellen (5'-SS, 3'-SS) und der BS in *S. pombe*, *H. sapiens* und *S. cerevisiae*. Die Sequenzlogos für *S. pombe* wurden mit Weblogo3 erstellt (Crooks et al., 2004). Die Höhe der Buchstaben repräsentiert den Grad der Konservierung der Base an dieser Position. Die Positionen der Basen im 5'-Exon besitzen negative Positionszahlen, die innerhalb des Introns positive. Die Nummerierung der BS beginnt neu bei 1. Der Pfeil markiert den BP. Die Abbildung der Sequenzlogos für *H. sapiens* und *S. cerevisiae* wurden Anthony und Pomeranz Krummel (2013) entnommen und modifiziert. Zu jedem Organismus wurde die Anzahl der Introns pro Gen angegeben (Schwartz et al., 2008). Modifiziert von Eckert (2015).

3 SR Proteine – Helfer bei der Intronerkennung

Sowohl beim konstitutiven Spleißen als auch beim alternativen Spleißen muss das Spleißosom die richtige 5'-Exon/5'-SS und BS/3'-SS erkennen, um die mRNA nach dem Spleißen in einem offenen Leseraster (engl. *open reading frame* (ORF)) zu halten. Dadurch, dass die SSs und BSs in intronreichen Organismen häufig nicht konserviert und somit auch nicht 100 % komplementär zu der jeweiligen Region in der U1 und U2 snRNA sind, wird die Erkennung des Introns erschwert. Die Zelle besitzt deswegen Mechanismen, die die Bindung der snRNAs an die prä-mRNA unterstützen und stabilisieren, wobei die sogenannten Serin/Arginin-reichen (SR) Proteine eine entscheidende Rolle spielen. Diese Proteine besitzen ein oder zwei N-terminale RNA-Erkennungsmotive (engl. *RNA recognition motif*

(RRM)), die an *cis*-regulatorische Elemente, den sogenannten ESE-Sequenzen (engl. *exonic splicing enhancer*), im Exon binden, und eine C-terminale Serin/Arginin-reiche RS-Domäne, die die Interaktion mit anderen Proteinen ermöglicht. Das klassische Modell postuliert, dass SR Proteine, die als *trans*-agierende Spleißfaktoren mit Komponenten des Spleißosoms interagieren, dazu beitragen, die spleißosomalen Komponenten zu den richtigen 5'- und 3'-SSs zu rekrutieren. SR Proteine rekrutieren nicht nur spleißosomale Proteinen während der Intronerkennung sondern interagieren auch mit diesen, um deren Bindung an die prä-mRNA zu stabilisieren (Abbildung 5) (Graveley, 2000). Es wird außerdem vermutet, dass SR Proteine die transienten Basenpaarungen sowohl zwischen der 5'-Exon/5'-SS und der U1 snRNA als auch zwischen der BS und der U2 snRNA stabilisieren können, indem die RS-Domäne selektiv die transiente doppelsträngige RNA kontaktiert (Shen und Green, 2006). Es ist bekannt, dass hsSRSF1 in Mammalia mit dem U1 Protein hsU1-70K (spU1-70K) interagiert und dadurch die Bindung des U1 snRNPs an die 5'-Exon/5'-SS stabilisiert (Kohtz et al., 1994; Xiao und Manley, 1997; Cao und Garcia-Blanco, 1998; Cho et al., 2011). Zusätzlich interagieren sowohl hsSRSF1 als auch hsSRSF2 (spSrp1) mit hsU2AF1 (spUaf2). Dabei wird die Bindung von hsU2AF1 an die 3'-SS verstärkt. Somit sind diese beiden SR Proteine auch an der Erkennung der 3'-SS beteiligt (Wu und Maniatis, 1993; Staknis und Reed, 1994; Zuo und Maniatis, 1996). Es konnte ebenfalls eine Interaktion des Spleißfaktors spUaf2 (hsU2AF1) mit spSrp2 (hsSRSF4/5/6) aus *S. pombe* nachgewiesen werden (Webb und Wise, 2004).

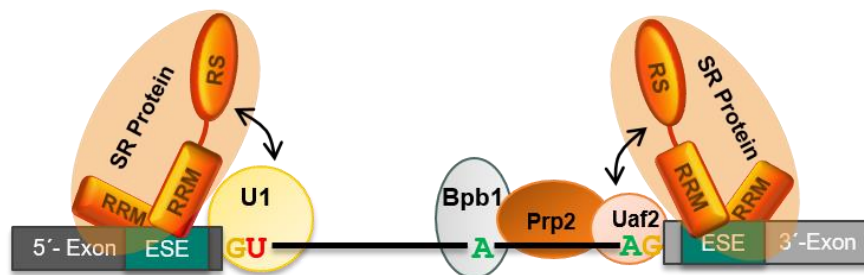


Abbildung 5| SR Proteine interagieren mit spleißosomalen Proteinen und stabilisieren deren Bindung an die prä-mRNA

SR Proteine binden an ESE-Sequenzen im Exon und interagieren mit spleißosomalen Proteinen. Dadurch ermöglichen und/oder stabilisieren sie deren Bindung an die prä-mRNA. ESE, *Exonic Splicing Enhancer*; RRM, *RNA recognition motif*; RS, RS-Domäne. Die Abbildung wurde in Anlehnung an Zhou und Fu (2013) erstellt und modifiziert.

Dabei wird sowohl die Lokalisation der SR Proteine in der Zelle, als auch ihre Bindung an die prä-mRNA und die Interaktion mit anderen Proteinen durch Phosphorylierung der RS-Domäne reguliert (Graveley, 2000; Tang et al., 2007; Cho et al., 2011). Durch Phosphorylierung wird in Mammalia auch die Lokalisation der SR Proteine innerhalb des Zellkerns beeinflusst. SR Proteine gelangen dadurch von *Speckles*, die im Zellkern als

Speicherorte für bestimmte Spleißfaktoren fungieren, zu Stellen aktiver Transkription (Misteli et al., 1997; Misteli et al., 1998; Graveley, 2000; Ngo et al., 2005; Keshwani et al., 2015). Ob *Speckles* auch in *S. pombe* existieren ist nicht bekannt.

Im Menschen sind 12 SR Proteine (hsSRSF1-12) bekannt, die vermutlich durch Genverdopplung entstanden sind (Busch und Hertel, 2012). Basierend auf der Homologie der RRM's wurden in *S. pombe* nur zwei SR Proteine identifiziert: das nicht-essentielle spSrp1 (hsSRSF2) und das essentielle spSrp2 (hsSRSF4/5/6) (Gross et al., 1998; Lützelberger et al., 1999; Plass et al., 2008; Busch und Hertel, 2012). In *S. cerevisiae* konnten keine typischen SR Proteine identifiziert werden. *S. cerevisiae* hat nur ein SR-ähnliches Protein, scNPL3, das am Spleißprozess beteiligt zu sein scheint (Kress et al., 2008; Andrée et al., 2016).

3.1 Die SR Proteine, spSrp1 und spSrp2, in *S. pombe*

Bei Betrachtung des Aufbaus der SR Proteine in *S. pombe* und dem Vergleich zu den entsprechenden orthologen Proteinen im Menschen, die basierend auf der Homologie der RRM's identifiziert werden konnten, können einige Unterschiede festgestellt werden (Abbildung 6). Das Protein spSrp1 ist 275 Aminosäuren und das Ortholog in *Homo sapiens* hsSRSF2 221 Aminosäuren lang (Abbildung 6, A). Beide Proteine haben eine RRM (hellgrau), gefolgt von Prolinen (blau), einer Glycin-Gelenkregion (engl. *glycine hinge region* (grün)) und einer C-terminalen RS-Domäne (gelb). Die RS-Domäne von spSrp1 ist allerdings, mit einer Länge von 59 Aminosäuren, im Vergleich zu der RS-Domäne von hsSRSF2, mit einer Länge von 105 Aminosäuren, kürzer. Der Definition zu Folge besteht die RS-Domäne eines SR Proteins aus mindestens 50 Aminosäuren mit einem Anteil von > 40% an Argininen und Serinen (Barta et al., 2010; Manley und Krainer, 2010; Busch und Hertel, 2012). Die RS-Domäne von spSrp1 entspricht mit einem RS-Anteil von 55,9 % einer echten RS-Domäne. Die RS-Domäne von hsSRSF2 hat einen RS-Anteil von 73,3 %. Das N-terminale RRM zeigt die hochkonservierten Submotive RNP-2 (dunkelgrau) und RNP-1 (schwarz) (Cléry und Allain, 2012), gefolgt von der konservierten Sequenz RDAEDA, die wahrscheinlich für die Bindung an die prä-mRNA verantwortlich und somit essentiell für die Funktion von spSrp1 ist (Gross et al., 1998). Die bekannten phosphorylierten Serine liegen fast alle in der RS-Domäne (Wilson-Grady et al., 2008; Carpy et al., 2014; Kettenbach et al., 2015; Swaffer et al., 2018). Die SR-Dipeptide, die normalerweise in SR-Domänen von SR Proteinen in *H. sapiens* zu finden sind, sind in spSrp1 häufig SP-Dipeptide (Gross et al., 1998; Andrée et al., 2016). Außerdem zeigt spSrp1 im Vergleich zu hsSRSF2 ein zusätzliches C-terminales Ende von etwa 100 Aminosäuren ohne bekannte Motive. Dieser Bereich enthält mehrere Glutamin-Reste und wird auch in vielen anderen Pilzen gefunden (Andrée et al., 2016). Es wurde außerdem gezeigt, dass dieses zusätzliche C-terminale

Ende sowie die RS-Domäne wichtig für die Funktion von spSrp1 sind. Eine mutierte RS-Domäne oder ein deletiertes C-terminales Ende führt zu Akkumulation von prä-mRNA *in vivo* (Gross et al., 1998).

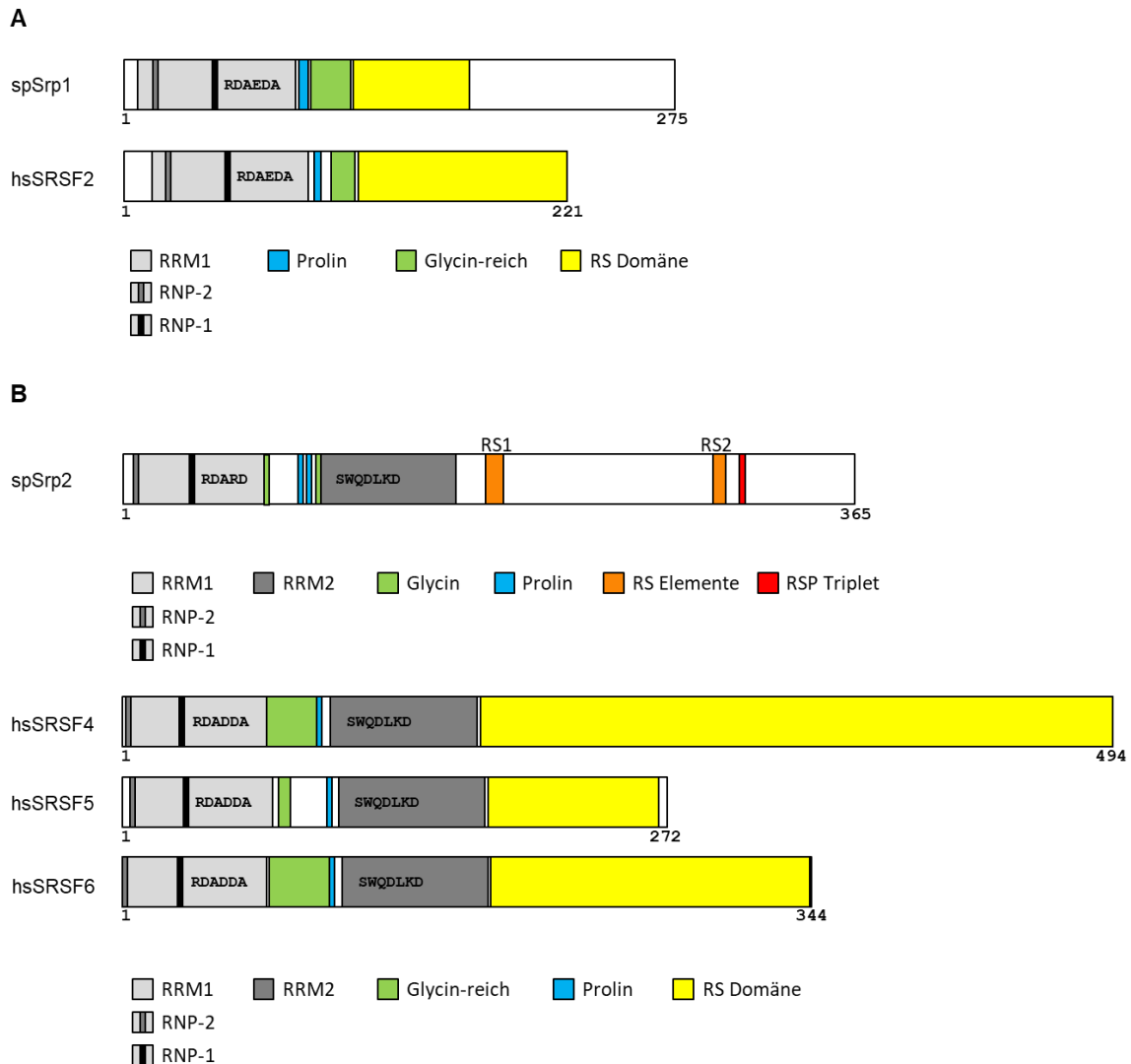


Abbildung 6| Struktur der SR Proteine, spSrp1 und spSrp2, aus *S. pombe* und den orthologen Proteinen im Menschen

Schematische Darstellung des (A) SR Proteins spSrp1 aus *S. pombe* und des orthologen Proteins aus *Homo sapiens* hsSRSF2 und des (B) SR Proteins spSrp2 aus *S. pombe* und den orthologen Proteinen aus *H. sapiens* hsSRSF4/5/6. Die Zahlen unter dem Schema geben die Gesamtlänge des Proteins an. Die konservierten Motive in den RRM (engl. *RNA recognition motif*), RNP-1 und RNP-2 (engl. *ribonucleoprotein consensus sequence*; RNP-CS), sind angegeben. Modifiziert von André et al. (2016).

Das zweite SR Protein aus *S. pombe*, spSrp2, ist 365 Aminosäuren und die potentiellen orthologen Proteine aus *H. sapiens* hsSRSF4/5/6 sind 494/272/344 Aminosäuren lang (Abbildung 6, B). Die vier Proteine haben alle zwei konservierte N-terminale RRM. RRM1 (hellgrau) zeigt ebenfalls die hochkonservierten Submotive RNP-2 (dunkelgrau) und RNP-1 (schwarz), gefolgt von der Sequenz RDARD in spSrp2 bzw. RDADDA in hsSRSF4/5/6. In RRM2 (dunkelgrau) ist in allen Proteinen das Motiv SWQDLKD zu finden. Dieses Motiv in

RRM2 ist in spSrp2 essentiell für die Funktion des Proteins (Lützelberger et al., 1999). Zwischen den beiden RRMs ist wiederum eine Glycin-Gelenkregion (engl. *glycine hinge region* (grün)) mit zusätzlichen Prolinen (blau) in allen Proteinen zu finden. Entsprechend der Definition von SR Proteinen ist spSrp2 allerdings kein echtes SR Protein. Der C-Terminus des Proteins hat keine richtige RS-Domäne sondern nur kurze RS-Elemente. Die zwei kurzen RS-Elemente in spSrp2 bestehen aus SR/SP-Dipeptiden (orange). Außerdem ist ein zusätzliches RSP Triplet direkt hinter dem RS2-Element zu finden (rot). Es ist bekannt, dass es insgesamt sieben Phosphorylierungsstellen in spSrp2 gibt, die hauptsächlich in den RS-Elementen zu finden sind (Wilson-Grady et al., 2008; Lützelberger und Käufer, 2012). Die potentiellen orthologen Proteine, hsSRSF4/5/6, haben hingegen eine RS-Domäne (gelb), die direkt hinter dem zweiten RRM beginnt. In dieser sind viele Phosphorylierungsstellen zu finden (Olsen et al., 2010; Rigbolt et al., 2011; Zhou et al., 2013; Bian et al., 2014). In anderen Pilzen ist ebenfalls ein potentielles orthologes Protein von spSrp2 zu finden. Diese Proteine besitzen ebenfalls wie spSrp2 keine echte RS-Domäne sondern nur RS-Elemente oder S/TPR bzw. RS/TP Triplets (Andrée et al., 2016). In Bezug auf die Lokalisation von spSrp2 in der Zelle sind die RS-Elemente notwendig und zugleich ausreichend, damit das Protein im Kern lokalisiert ist. Sind die Serine in den RS-Elementen zu Alaninen mutiert, akkumuliert das Protein im Zytoplasma (Lützelberger et al., 1999). Ob eine Phosphorylierung der Serine für den Kernimport notwendig ist, ist allerdings nicht bekannt. Für Mammalia ist ebenfalls bekannt, dass die RS-Domäne einiger SR Proteine auch für die Lokalisierung in den Kern erforderlich ist. Es gibt in Mammalia zwei Kernimportrezeptoren, die spezifisch für SR Proteine sind: Transportin-SR1 (hsTRN-SR1) und Transportin-SR2 (hsTRN-SR2). Diese beiden Rezeptoren sind alternativ gespleißte Formen des gleichen Gens, das für das humane β -karyopherin Transportin 3 (hsTnpo3/spMtr10) kodiert. Diese Rezeptoren importieren SR Proteine indem sie mit den RS-Domänen interagieren (Kataoka et al., 1999; Yun et al., 2003; Maertens et al., 2014). Da es in *S. pombe* ein orthologes Gen gibt, das für spMtr10 (hsTnpo3) kodiert, liegt es nahe, dass der Kernimport in *S. pombe* ebenfalls über diesen Kernimportrezeptor und somit über die RS-Elemente in spSrp2 stattfindet.

3.2 *Cis*-regulatorische Elemente in Exons und Introns

Wie zuvor beschrieben binden SR Proteine über ihre RRMs an *cis*-regulatorische Elemente. Generell sind *cis*-regulatorische Elemente in Exons und Introns sogenannte *splicing regulatory elements* (SREs), die in Mammalia *trans*-agierende Spleißfaktoren rekrutieren. Diese haben wiederum entweder eine aktivierende oder eine inhibierende Wirkung auf die Intronerkennung. Dabei wird zwischen *Exonic Splicing Enhancer* (ESE) sowie *Silencer* (ESS) -Sequenzen im Bereich der Exons und *Intronic Splicing Enhancer* (ISE) und *Silencer* (ISS) -Sequenzen im Bereich der Introns unterschieden (Wang und Burge, 2008). Diese

SREs haben sowohl für das konstitutive als auch für das alternative Spleißen eine wichtige Funktion. *Enhancer*- insbesondere ESE-Sequenzen sind oft in Exons von konstitutiv gespleißten Introns zu finden, um das effiziente Herausspleißen des Introns mit Hilfe von SR Proteinen sicherzustellen. Binden SR Proteine an ähnliche Sequenzen allerdings im Bereich des Introns, können sie das Herausspleißen des Introns während des alternativen Spleißens verhindern (Graveley, 2000; Erkelenz et al., 2013; Wang et al., 2013; Jeong, 2017). Viele ESE-Sequenzen bestehen häufig aber nicht ausschließlich aus Purin-reichen Sequenzen und sind stark degeneriert (Liu et al., 1998; Schaal und Maniatis, 1999; Fu und Ares, 2014). Es wurden kurze Sequenzabschnitte von 6-8 Nukleotiden als ESE-Sequenzen identifiziert. So konnte für hsSRSF1 die Sequenz CRSMSGW (mit R=A/G, S=C/G, M=A/C, W=A/U) bzw. als Purin-reiche Kernsequenz GAAGAA und für hsSRSF2 die Sequenz GRYYMCYR (mit R=A/G, Y=C/U, M=A/C) ermittelt werden (Liu et al., 1998; Blencowe, 2000; Liu et al., 2000; Cartegni et al., 2002; Sanford et al., 2009; Änkö et al., 2012; Pandit et al., 2013). Es konnte gezeigt werden, dass einige ESE-Sequenzen aus Mammalia in *S. pombe* funktionell sind und die Spleißeffizienz des untersuchten Reportergens verbessern. Es wurde außerdem eine putative *Enhancer*-Sequenz in Exon 6 von *spsrp2* identifiziert. Interessanterweise hat aber ein Austausch dieser Sequenz in Exon 6 von *spsrp2* mit der komplementären Sequenz *in vivo* keinen Einfluss auf die Spleißeffizienz der angrenzenden Introns (Webb et al., 2005). Basierend auf einer bioinformatischen Analyse wurde die Hypothese aufgestellt, dass 80 % der Exons in *S. pombe* ESE-Sequenzen besitzen, die mit den putativen ESE-Motiven aus Mammalia übereinstimmen (Drabenstot et al., 2003). Ob nun tatsächlich typische *Enhancer*-Sequenzen in *S. pombe* existieren, die SR Proteine binden und die Spleißeffizienz von Introns verbessern, ist bisher nicht bekannt. *Silencer*-Sequenzen sowie hnRNP (engl. *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein*) Proteine, als Antagonisten zu den SR Proteinen, spielen eine wichtige Rolle während der Kontrolle des alternativen Spleißens in Mammalia. *S. pombe* besitzt keine Gene, die für hnRNPs kodieren (Graveley, 2000; Keren et al., 2010; Erkelenz et al., 2013; Wang et al., 2013; Zhou und Fu, 2013; Fu und Ares, 2014; Xie, 2014; Bradley et al., 2015; Lee und Rio, 2015; Jeong, 2017).

4 An der Intronerkennung beteiligte Kinasen

Neben den SR Proteinen, die an *cis*-regulatorische Elemente binden und mit Spleißfaktoren interagieren, ist aus Mammalia bekannt, dass auch Kinasen während der Intronerkennung von Bedeutung sind. Diese beeinflussen die Interaktion zwischen SR Proteinen und Spleißfaktoren durch Phosphorylierung (Cho et al., 2011). *S. pombe* hat insgesamt 107 Proteinkinasen im Genom kodiert, wovon 17 essentiell für das Zellwachstum sind (Cipak et al., 2011). Es konnte gezeigt werden, dass eine dieser essentiellen Kinasen während der Intronerkennung und der Prä-Spleißosombildung entscheidend ist: die essentielle spPrp4

(hsPRPF4B) Kinase (Rosenberg et al., 1991; Kuhn und Käufer, 2003; Bottner et al., 2005; Eckert et al., 2016). Außerdem wird angenommen, dass noch zwei weitere nicht-essentiellen Kinasen, spDsk1 (hsSRPK1/2/3) und spLkh1 (hsCLK1/2/3/4) Kinase, bei der Intronerkennung involviert sind (Tang et al., 2011; Lipp et al., 2015) .

4.1 Die essentielle spPrp4 Kinase und ihre Funktion während der Intronerkennung

Die essentielle Serin/Threonin Kinase spPrp4 (hsPRPF4B) gehört zur Familie der DYRKs (engl. *dual specificity tyrosine-regulated kinases*) und bildet dort die Unterfamilie der PRP4s (engl. *pre-mRNA processing protein 4 kinases*) (Alahari et al., 1993; Aranda et al., 2011). Ursprünglich wurde das Gen, das für die Prp4 Kinase kodiert, in *S. pombe* bei der Suche nach temperatursensitiven Mutanten identifiziert, die einen Defekt bei der prä-mRNA Prozessierung (prp, engl. *pre-mRNA processing*) zeigen. Das mutierte Allel *prp4-73^{ts}* führt bei einem *Shift* der Zellen zur restriktiven Temperatur von 36 °C zu einer Akkumulation von prä-mRNA. Außerdem wird ein Wachstumsstopp in der G1- und G2-Phase des Zellzyklus beobachtet (Rosenberg et al., 1991; Alahari et al., 1993; Schwelnus et al., 2001). Es konnte auch gezeigt werden, dass die Kinasedomäne der hsPRPF4B Kinase das mutierte Allel *prp4-73^{ts}* in *S. pombe* funktionell komplementiert (Gross et al., 1997). spPrp4 Kinase ist ausschließlich im Kern lokalisiert (Richert, 2002).

Kürzlich wurde eine analog-sensitive spPrp4 Kinase (*prp4-as2*) benutzt, um die Funktion dieser essentiellen Kinase während der Mitose zu untersuchen. Diese kann durch Zugabe des ATP-analogen Inhibitors 1NM-PP1 reversibel gehemmt werden (Eckert et al., 2016). Die Inhibition der spPrp4_{as2} Kinase zeigt sowohl einen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Zellen als auch auf die Intronerkennung. Nach der Inhibition arretieren die Zellen in der G1- und G2-Phase des Zellzyklus für ca. drei Stunden bevor sie mit der Teilung fortfahren. Außerdem ist das Spleißverhalten einiger Introns von 10 Min. bis ca. 90 Min. nach Inhibition der Kinase beeinflusst. Sowohl die Analyse einzelner Introns durch semiquantitative RT-PCR als auch eine Sequenzierung der Gesamt-RNA zeigen, dass nach Inhibition der spPrp4 Kinase zwei Klassen von Introns existieren. Die eine Klasse, die Prp4-abhängigen Introns, brauchen die Aktivität der spPrp4 Kinase, um erkannt und gespleißt zu werden und akkumulieren prä-mRNA nach Inhibition der Kinase, während die mRNA stark abnimmt oder sogar verschwindet. Die Akkumulation von prä-mRNA ist zeitabhängig, sodass ein typisches Spleiß-Inhibitionsmuster zu beobachten ist. Dieses setzt direkt nach Inhibition der Kinase ein. Das Verhältnis von prä-mRNA zu mRNA dreht sich allerdings nach ca. 90 Min. erneut um, sodass die Transkripte wieder gespleißt in der Zelle vorliegen. Die andere Klasse, die Prp4-unabhängigen Introns, wird hingegen auch ohne die Aktivität der Kinase erkannt und gespleißt. Diese Introns werden auch nach Inhibition der Kinase weiterhin effizient gespleißt und es liegt zu allen Zeitpunkten mehr mRNA als prä-mRNA vor. Die Prp4-Abhängigkeit ist

intronspezifisch und nicht genspezifisch. Somit können in einem Gen alle Introns Prp4-abhängig oder -unabhängig gespleißt werden, aber es existieren auch Gene, die beide Intronklassen enthalten. Durch mehrere Mutationsanalysen der 5'-SS und BS des Introns eines Reportergens, konnte gezeigt werden, dass die Information, ob ein Intron Prp4-abhängig oder -unabhängig gespleißt wird, überwiegend von der Sequenz in diesen Bereichen abhängt. Introns mit starken 5'-SSs und BSs, das heißt mit Sequenzen, die eine hohe Komplementarität zur U1 bzw. U2 snRNA zeigen, benötigen die Aktivität der spPrp4 Kinase nicht, um erkannt und effizient gespleißt zu werden. Im Gegensatz dazu brauchen Introns mit schwachen 5'-SSs oder BSs, die eine geringe Komplementarität zur jeweiligen U snRNA zeigen, die Aktivität der Kinase, um erkannt und effizient gespleißt zu werden (Eckert et al., 2016; Andrée-Busch et al., 2018).

4.2 Die zwei nicht-essentiellen Kinasen spDsk1 und spLkh1

Die nicht-essentielle spDsk1 Kinase gehört zur Familie der SRPKs (engl. *serine-arginine protein kinases*) (Tang et al., 1998; Tang et al., 2000; Aranda et al., 2011; Giannakouros et al., 2011). Ursprünglich wurde das *spdsk1⁺* Gen als Suppressor der kalt-sensitiven *spdis1* Mutante identifiziert, die Defekte während der Schwesterchromatidtrennung und somit im Zellzyklus zeigt. Daraus wurde geschlossen, dass spDsk1 an der Zellzykluskontrolle beteiligt ist (Takeuchi und Yanagida, 1993). Erst fünf Jahre später wurde gezeigt, dass spDsk1 wahrscheinlich auch am Spleißen beteiligt ist. Diese Kinase phosphoryliert SR Proteine (Tang et al., 1998). Die spLkh1 Kinase gehört zur Familie der CLKs (engl. *cdc2-like kinases*) (Kim et al., 2001; Tang et al., 2003; Aranda et al., 2011). Die Kinasen der Familie der CLKs phosphorylieren genau wie die der SRPKs verschiedene SR Proteine aus Mammalia und können so deren Aktivität beeinflussen (Colwill et al., 1996b; Colwill et al., 1996a). Die gleichzeitige Deletion von *spdsk1⁺* und *splkh1⁺* führt in *S. pombe* zu einem schweren Wachstumsdefekt und die Zellen teilen sich extrem langsam (Tang et al., 2000; Tang et al., 2003). Die beiden Kinase spDsk1 und spLkh1 sind hauptsächlich aber nicht ausschließlich im Kern lokalisiert (Takeuchi und Yanagida, 1993; Tang et al., 2011; Tang et al., 2012).

Für spDsk1 konnte mit Hilfe eines *Splicing Microarrays* kürzlich gezeigt werden, dass Introns ähnlich der Prp4-Abhängigkeit auch eine Dsk1-Abhängigkeit besitzen können. Dabei wurde festgestellt, dass sowohl in etwa eine gleiche Anzahl als auch eine ähnliche Gruppe von Introns, nämlich Introns mit schwachen SSs und BSs, nach Inhibition der spPrp4_{as2} bzw. spDsk1_{as2} Kinase betroffen sind. Überraschenderweise zeigte die Inhibition von spLkh1_{as2} keinen signifikanten Einfluss auf die Spleißeffizienz der getesteten Introns. Daraus wurde gefolgert, dass die Kinasen spPrp4 und spDsk1 einen großen Einfluss auf die Intronerkennung in *S. pombe* haben, während spLkh1 Kinase unter Standardwachstumsbedingungen entbehrlich zu sein scheint (Lipp et al., 2015).

4.3 Der Zusammenhang zwischen den Kinasen und den SR Proteinen in *S. pombe*

In Bezug auf die Substrate der drei Kinasen spPrp4 (hsPRPF4B), spDsk1 (hsSRPK1/2/3) und spLkh1 (hsCLK1/2/3/4) gibt es große Unterschiede. Es konnte gezeigt werden, dass das spleißosomale Protein spPrp1 (hsPRPF6) ein physiologisches Substrat der spPrp4 Kinase in *S. pombe* ist (Schwelnus et al., 2001). Die hsPRPF4B Kinase phosphoryliert ebenfalls das spleißosomale Protein hsPRPF6 (spPrp1) aber auch hsPRPF31 (spPrp31), sowie nicht spleißosomale Proteine (Schneider et al., 2010b). In *S. pombe* hingegen ist bisher nur ein weiteres *in vitro* Substrat der spPrp4 Kinase, das SR Protein spSrp2, bekannt (Lützelberger und Käufer, 2012). Dieses Protein wird ebenfalls von spDsk1 und spLkh1 Kinase phosphoryliert. Im Gegensatz dazu ist das andere SR Protein in *S. pombe*, spSrp1, nur ein Substrat der beiden nicht-essentiellen Kinasen spDsk1 und spLkh1 (Tang et al., 2007). Es konnte gezeigt werden, dass die beiden SR Proteine *in vitro* einen Komplex bilden können, was zu verringerter Phosphorylierung durch spDsk1 Kinase führt. Auf der anderen Seite hemmt die spDsk1-vermittelte Phosphorylierung die Interaktion zwischen den beiden SR Proteinen, insbesondere wenn spSrp1 phosphoryliert vorliegt (Tang et al., 2002). Ob und wie eine Interaktion zwischen den SR Proteinen *in vivo* in *S. pombe* stattfindet und ob diese über Phosphorylierung durch die Kinasen reguliert wird, ist bisher nicht bekannt und bleibt zu klären.

5 Fragestellungen und Ziele dieser Arbeit

In dieser Arbeit wird untersucht, welche Rolle die Serin/Threonin Kinase Prp4 bei der Intronerkennung in *S. pombe* spielt. Zunächst soll mit Hilfe der RNA-Immunopräzipitation (RIP) untersucht werden, welches der erste Schritt der Intronerkennung in *S. pombe* ist. Außerdem sollen neue *in vitro* Substrate der Prp4 Kinase ermittelt werden. Es ist bekannt, dass das SR Protein Srp2 ein *in vitro* Substrat der Prp4 Kinase ist. Deswegen soll untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen der Prp4 Kinase-Abhängigkeit von Introns und den SR Proteinen, Srp1 und Srp2, aus *S. pombe* besteht. Dabei wird ein Stamm verwendet, der die analog-sensitive Prp4 Kinase (Prp4_{as2}) exprimiert, *srp1* deletiert und *srp2* reprimiert hat. Nach Inhibition der Prp4_{as2} Kinase soll die Spleißeffizienz einzelner Introns mittels RT-PCR betrachtet und in einem ganzheitlichen Ansatz die Sequenzierung der Gesamt-RNA durchgeführt werden, um den Einfluss der fehlenden SR Proteine auf die Prp4-Abhängigkeit der Introns zu untersuchen. Außerdem soll der Einfluss der Deletion der beiden nicht-essentiellen Kinasen, Dsk1 und Lkh1, auf die Prp4 Kinase-Abhängigkeit von Introns analysiert werden. Dabei wird die Spleißeffizienz einzelner Introns mittels RT-PCR betrachtet. Es soll auch überprüft werden, ob die Lokalisation des SR Proteins Srp2 durch die Deletion von *dsk1* und *lkh1* beeinflusst wird. Zur Überprüfung, ob die Erkennung und Prp4 Kinase-Abhängigkeit von Introns auch durch Mutationen im Bereich des 5'-Exons oberhalb der X₃X₂X₁/5'-SS beeinflusst wird, werden zwei Reportergene konstruiert und in den *leu1*-Lokus der Hefe integriert. Das erste Reportergen ist *res1'*, das ein Prp4-abhängiges Intron hat, und das zweite ist *trs402'*, das ein Prp4-unabhängiges Intron hat. Durch Mutagenese der X₃X₂X₁/5'-SS soll das Prp4-abhängige Intron des Reportergens *res1'* in ein Prp4-unabhängiges Intron und das Prp4-unabhängige Intron des Reportergens *trs402'* in ein Prp4-abhängiges umgewandelt werden. Dazu wird in dem Prp4-abhängig gespleißten Reportergen *res1'* die Komplementarität der X₃X₂X₁/5'-SS zur U1 snRNA erhöht und in dem Prp4-unabhängigen Reportergen *trs402'* verringert. Anhand dieser vier Reportergen-Konstrukte soll eine Mutationsanalyse der Sequenz im Bereich des 5'-Exons oberhalb der X₃X₂X₁/5'-SS durchgeführt und die Auswirkung auf die Erkennung und Prp4-Abhängigkeit des Introns analysiert werden. Es soll außerdem untersucht werden, ob die veränderte Sequenz unterschiedliche Auswirkungen auf Prp4-abhängige und -unabhängige Introns hat. Im Anschluss wird die Spleißeffizienz der einzelnen Konstrukte ohne und mit Inhibition der Prp4_{as2} Kinase durch RT-PCR untersucht. Diese Ergebnisse sollen aufklären, welche Komponenten neben der Prp4 Kinase an der Intronerkennung beteiligt sind, die das Herausspleißen von Introns mit schwachen Spleißstellen sicherstellen. Dies könnte erste Hinweise für eine Erklärung geben, warum *S. pombe* schwache Spleißstellen und die Komponenten, die für das effiziente Spleißen dieser Introns erforderlich sind, besitzt.

II Ergebnisse

1 Die Intronerkennung erfolgt in *S. pombe* zuerst durch Anlagerung des U1 snRNPs an der 5'-Exon/5'-SS

Gemäß dem klassischen Modell zur Assemblierung des Spleißosoms, das überwiegend auf *in vitro* Experimenten basiert, wird von einem schrittweisen Aufbau des Spleißosoms ausgegangen (Rino und Carmo-Fonseca, 2009; Wahl et al., 2009). *In vivo* scheint es allerdings auch möglich zu sein, dass sich die snRNPs, anders als bei einem schrittweisen Aufbau, vorher als prä-katalytisches Spleißosom zusammenlagern und dann an die prä-mRNA binden (Chen et al., 2007; Kotzer-Nevo et al., 2014). Dabei wurde gezeigt, dass das Spleißosom aus verschiedenen Organismen sowohl als Tetra-snRNP als auch als Penta-snRNP isoliert werden kann und das Intron somit prä-assembliert erkennt (Konarska und Sharp, 1988; Gottschalk et al., 1999; Stevens et al., 2002).

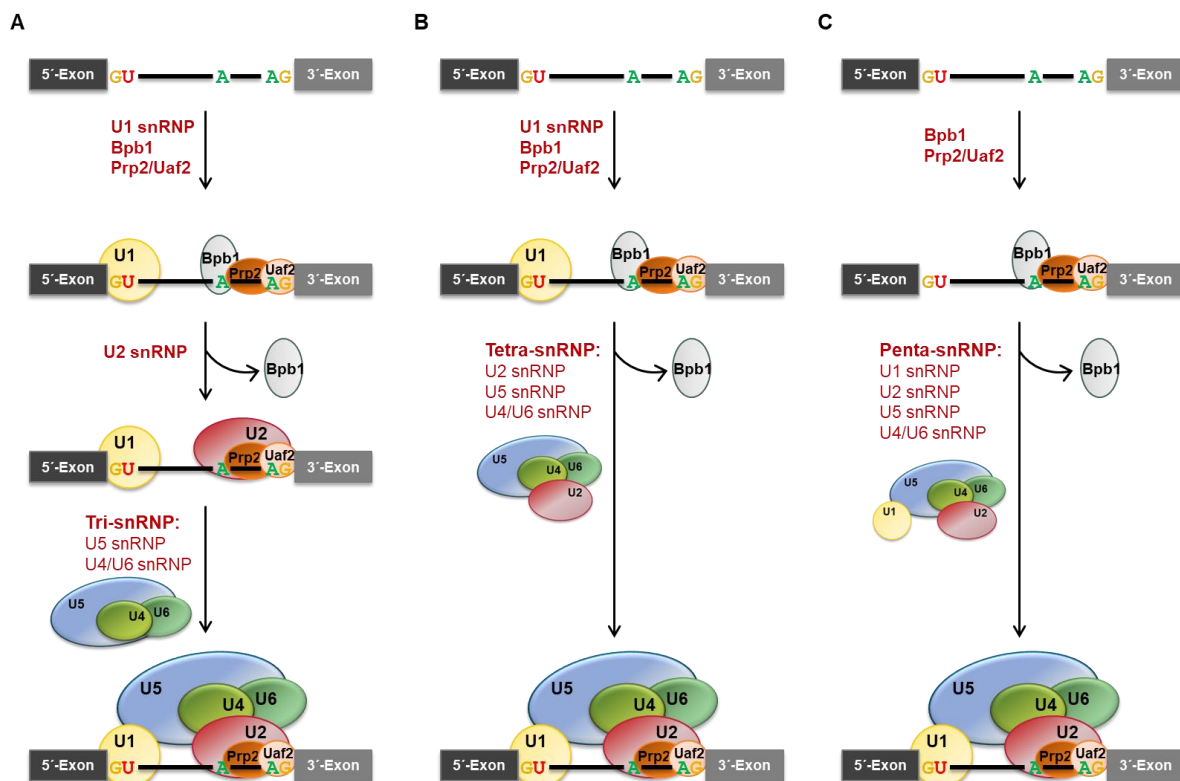


Abbildung 7| Schematische Darstellung der Assemblierung des Spleißosoms auf der prä-mRNA

(A) Schrittweise Assemblierung. Zuerst lagert sich der U1 snRNP an die Exon1/5'-SS an und die Proteine Bpb1, Prp2 und Uaf2 erkennen das 3'-Ende des Introns. Dann bindet der U2 snRNP an das 3'-Ende des Introns. Letztendlich wird das Spleißosom durch die Bindung eines vorgeformten Tri-snRNPs, bestehend aus U4/U6 und U5, vervollständigt. (B) Assemblierung als Tetra-snRNP. Nach der Assoziation des U1 snRNPs an die Exon1/5'-SS und der Proteine Bpb1, Prp2 und Uaf2 an das 3'-Ende des Introns, kommt es zur Anlagerung eines vorgeformten Tetra-snRNPs, bestehend aus U2, U4/U6 und U5. (C) Assemblierung als Penta-snRNP. Die Proteine Bpb1, Prp2 und Uaf2 lagern sich an das 3'-Ende des Introns an und alle snRNPs erreichen, als vorgeformter Penta-snRNP, die prä-mRNA.

Insgesamt gibt es drei Möglichkeiten wie ein Intron erkannt werden kann: Zum einen kann eine schrittweise Assemblierung des Spleißosoms erfolgen, bei der zuerst die 5'-Exon/5'-SS durch den U1 snRNP und das 3'-Ende durch die drei Proteine Bpb1, Prp2 und Uaf2 erkannt und gebunden wird. Dann erfolgt die Anlagerung des U2 snRNP an der 3'-SS, gefolgt von der des restlichen Spleißosoms als Tri-snRNP (Abbildung 7, A). Die zweite Möglichkeit ist, dass im ersten Schritt ebenfalls die Erkennung der 5'-Exon/5'-SS durch den U1 snRNP und die des 3'-Endes durch die drei Proteine Bpb1, Prp2 und Uaf2 stattfindet und sich das restliche Spleißosom anschließend als Tetra-snRNP anlagert (Abbildung 7, B). Als dritte Möglichkeit erfolgt als erstes die Erkennung am 3'-Ende des Introns durch die drei Proteine Bpb1, Prp2 und Uaf2. Danach lagert sich das komplette Spleißosom als vorgeformter Penta-snRNP an die prä-mRNA an (Abbildung 7, C).

Kürzlich wurde gezeigt, dass die Aktivität der Prp4 Kinase bei der Erkennung von Introns aus *S. pombe* mit schwachen Spleißstellen benötigt wird und somit die Sequenz der 5'-Exon/5'-SS mit entscheidend ist, ob ein Intron Prp4-abhängig oder -unabhängig gespleißt wird (Eckert et al., 2016; Andrée-Busch et al., 2018). Es stellte sich nun die Frage welche Proteine am ersten Schritt der Intronerkennung *in vivo* beteiligt sind, um Rückschlüsse auf potentielle neue Substrate der Prp4 Kinase ziehen zu können. Außerdem sollte geklärt werden ob sich das Spleißosom *in vivo* in einem schrittweisen Aufbau zusammenlagert oder prä-assembliert das Intron erkennt.

Tabelle 1| Getaggte Proteine mit zugeordnetem snRNP

U1-70K, U1A, U1C, U1H, Lea1, Msl1 und Brr2 sind snRNP spezifische Proteine. Bpb1 und Uaf2 erkennen das 3'-Ende des Introns und die RNA-Polymerase II (Pol II) wurde als Positivkontrolle verwendet.

Protein	snRNP
U1-70K-HA	U1
HA-U1A	U1
U1C-HA	U1
U1H-HA	U1
HA-Bpb1	-
Uaf2-HA	-
Lea1-TAP	U2
Msl1-HA	U2
Brr2-HA	U5
Pol II-HA	-

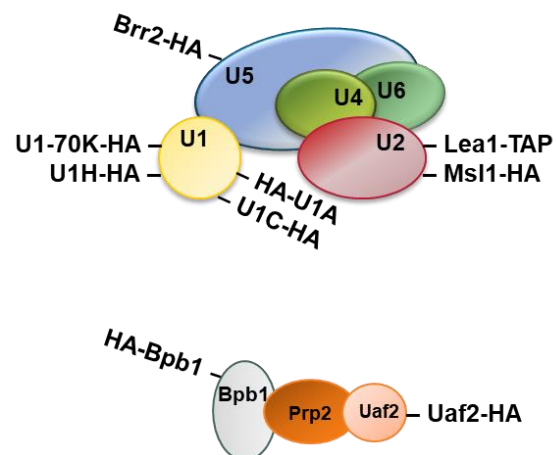


Abbildung 8| Schematische Darstellung der getaggtten Proteine

U1-70K, U1A, U1C und U1H sind spezifisch für den U1 snRNP. Die Proteine Bpb1 und Uaf2 sind für die Erkennung des 3'-Endes des Introns verantwortlich. Lea1 und Msl1 sind spezifisch für den U2 snRNP. Brr2 ist spezifisch für den U5 snRNP. Alle Proteine, bis auf Lea1, wurden als HA-getaggte Versionen verwendet. Lea1 lag als TAP-getaggte Version vor.

In dieser Arbeit wurde eine RNA-Immunopräzipitation (RIP) mit anschließender qRT-PCR, basierend auf dem Protokoll von (Gilbert und Svejstrup, 2006), durchgeführt, um die drei Möglichkeiten der Assemblierung des Spleißosoms zu überprüfen. Bei dieser Methode wird gezielt mit einem getaggtten Protein eines spezifischen snRNPs die Immunopräzipitation durchgeführt und anschließend die gebundene RNA durch qRT-PCR amplifiziert. Die verwendeten Proteine für die Immunopräzipitation liegen in den jeweiligen Stämmen als getaggte Versionen vor. Zur Untersuchung des U1 snRNPs wurden vier spezifische Proteine ausgewählt: U1-70K, U1A, U1C und U1H. Außerdem wurden die Proteine Bpb1 und Uaf2 verwendet. Der Nachweis des U2 snRNPs erfolgte mit Lea1 und Msl1. Repräsentativ für den U5 snRNP wurde Brr2 ausgewählt. Es wurde außerdem mit der RNA-Polymerase II (Pol II) als Positivkontrolle immunopräzipitiert, da diese an jedem Transkript nachzuweisen sein sollte. Lea1 wurde als C-terminal TAP-getaggte Version und alle anderen Proteine entweder als N- oder C-terminal HA-getaggte Versionen verwendet (Tabelle 1, Abbildung 8). Diese wurden zuvor über homologe Rekombination in den Originalloкус in *S. pombe* integriert.

Nach der RIP wurden insgesamt vier Gene durch qRT-PCR analysiert, um eine Aussage über die ko-präzipitierte RNA-Menge und damit einen Rückschluss auf die gebundene Proteinmenge treffen zu können. In einer qRT-PCR wird nach jedem PCR-Zyklus die Menge an entstandenem Amplifikat gemessen. Die Anzahl an PCR-Zyklen, die benötigt wurden, um einen festgelegten Schwellenwert zu überschreiten (Ct-Wert), liefert eine Aussage über die Ausgangs-RNA-Menge. Um den Anteil an präzipitierter RNA (IP) an der Gesamt-RNA (Input) ermitteln zu können, werden die Ct-Werte der IP-Proben mit denen der entsprechenden Input-Proben verrechnet. Die Input-Proben stammen von derselben Hauptkultur und werden, bis auf die Immunpräzipitation, wie die IP-Proben behandelt. Des Weiteren wird bei jeder qRT-PCR über eine Verdünnungsreihe die Primereffizienz berechnet, welche in die Formel zur Berechnung des Anteils der IP am Input mit eingeht, um Schwankungen auszugleichen.

$$\% \text{ Input} = \frac{\text{Primereffizienz}^{[\text{Ct-Wert}(\text{Input}) - \text{Ct-Wert}(\text{IP})]}}{2}$$

Zum einen wurde das intronlose Gen *his5* untersucht, das als Negativkontrolle für spleißosomalen Proteine diente, wohingegen die Pol II nachgewiesen werden sollte, da das Gen transkribiert wird. Zum anderen wurden zwei Prp4 Kinase-unabhängigen Gene, *dbp2* und *srp54*, und ein Prp4-abhängiges Intron, *prs5*, untersucht. Alle untersuchten intronhaltigen Gene besitzen Introns mit einer Größe von 422 nt bis 699 nt. Diese sind die größten Introns, die in *S. pombe* zu finden sind, und wurden verwendet, damit zwischen dem vorderen und hinteren Bereich des Introns in der qRT-PCR durch spezifische Primer unterschieden werden kann. Anschließend wurde der vordere (5'-Exon/5'-SS) mit dem

hinteren Bereich (BS/3'-SS) des Introns verglichen. Anhand dieser Ergebnisse kann darauf geschlossen werden, welche snRNPs an welcher Position des Transkripts gefunden werden können und somit auch welche spleißosomalen Proteine sich zu welchem Zeitpunkt auf dem Transkript assemblieren.

Wird mehr von den U1 snRNP Proteinen im vorderen, mehr von den U2 snRNP Proteinen im hinteren und die gleiche Menge des U5 snRNP Proteins sowohl im vorderen als auch im hinteren Bereich gefunden, kann davon ausgegangen werden, dass sich das Spleißosom schrittweise auf der prä-mRNA assembliert (Abbildung 7, A). Wird mehr von den U1 snRNP Proteinen im vorderen und die gleiche Menge der U2 und U5 snRNP Proteine im vorderen und hinteren Bereich gefunden, kann davon ausgegangen werden, dass sich zuerst der U1 snRNP und dann ein vorgeformter Tetra-snRNP auf der prä-mRNA assembliert (Abbildung 7, B). Wird von allen getesteten Proteinen sowohl im vorderen als auch im hinteren Bereich die gleiche Menge gefunden, kann davon ausgegangen werden, dass sich die spleißosomalen Proteine als vorgeformter Penta-snRNP an die prä-mRNA anlagern (Abbildung 7, C). Da das 3'-Ende des Introns im ersten Schritt durch die drei Proteine Bpb1, Prp2 und Uaf2 erkannt wird, sollte von diesen bei allen drei Möglichkeiten im hinteren Bereich eine größere Menge als im vorderen Bereich zu finden sein (Abbildung 7).

Die qRT-PCR Ergebnisse des intronlosen Gens *his5* zeigen, dass keine spleißosomalen Proteine an diesem Transkript nachgewiesen werden können. Die Pol II kann mit einem signifikanten Unterschied zum Wildtyp (WT, Stamm L972) an dem Transkript detektiert werden (Abbildung 9 + Anhang: Tabelle 23, S. 143).

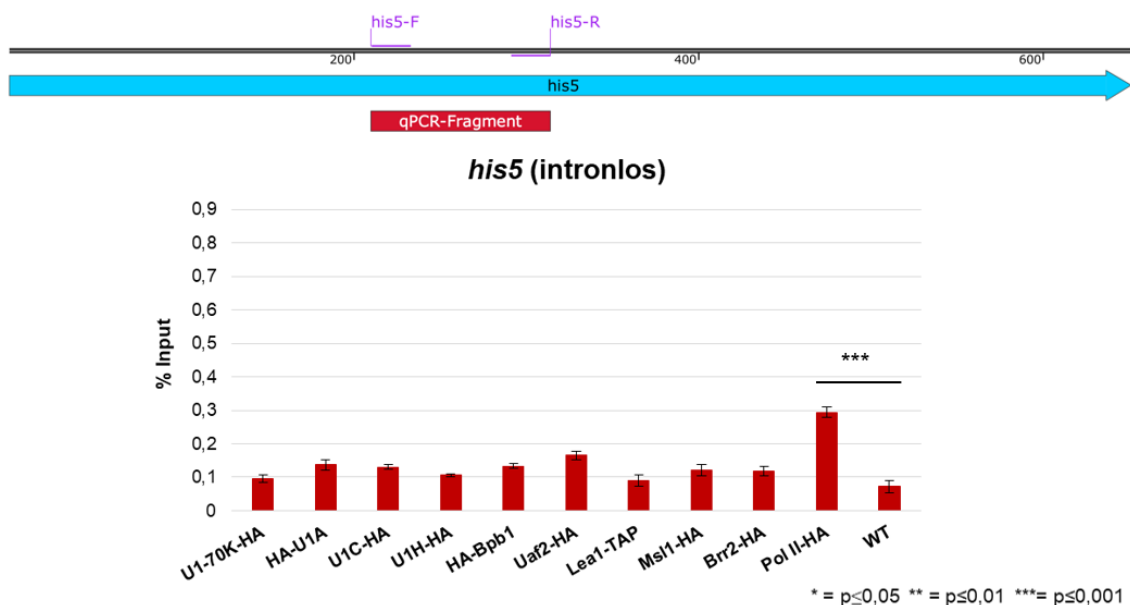


Abbildung 9 | qRT-PCR Ergebnisse am intronlosen Gen *his5* nach der RIP

Schematische Darstellung des Gens *his5* mit den in der qRT-PCR verwendeten Primern und dem amplifizierten Fragment. Es konnte kein spleißosomales Protein an dem Transkript nachgewiesen werden, allerdings aber die RNA Polymerase II. Der signifikante Unterschied zur WT-Kontrolle auf dem * $\leq 5\%$ Niveau, ** $\leq 1\%$ Niveau und *** $\leq 0,1\%$ Niveau ist angegeben. Die angegebenen Standardabweichungen wurden anhand von drei biologischen Replikaten bestimmt, wobei jedes biologische Replikat aus zwei technischen Replikaten bestand. WT, Wildtyp Stamm L972.

II Ergebnisse

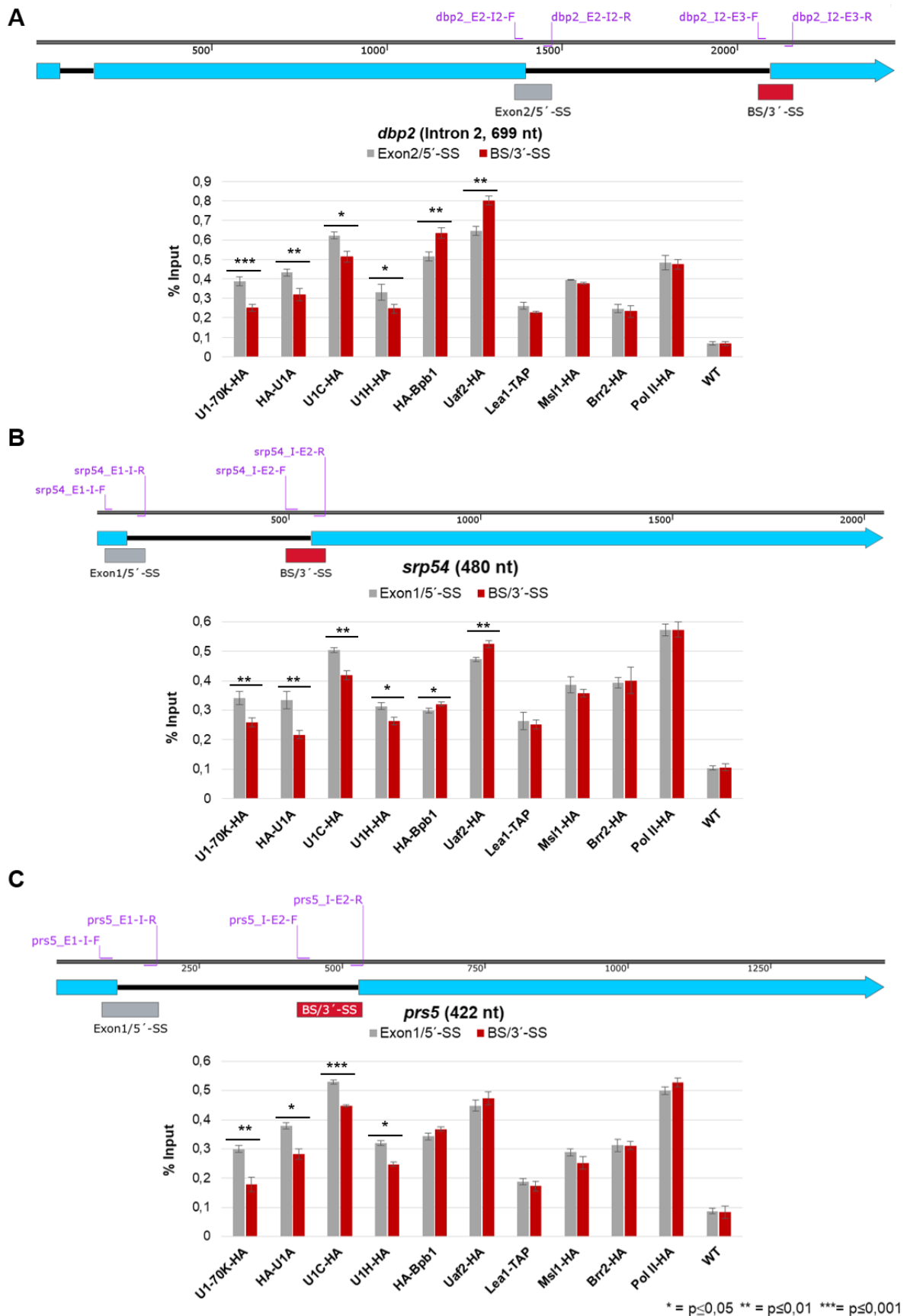


Abbildung 10| qRT-PCR Ergebnisse der Gene *dbp2*, *srp54* und *prs5* nach der RIP

Schematische Darstellung der Gene (A) *dbp2*, (B) *srp54* und (C) *prs5* mit den in der qRT-PCR verwendeten Primern und den amplifizierten Fragmenten. Außerdem sind die Ergebnisse der qRT-PCR in den Diagrammen gezeigt, bei denen der vordere

(5'-Exon/5'-SS, grau) mit dem hinteren Bereich (BS/3'-SS, rot) des Introns verglichen wird. Der signifikante Unterschied zwischen dem vorderen und dem hinteren Bereich des Introns auf dem * ≤ 5 % Niveau, ** ≤ 1 % Niveau und *** $\leq 0,1$ % Niveau ist angegeben. Die angegebenen Standardabweichungen wurden anhand von drei biologischen Replikaten bestimmt, wobei jedes biologische Replikat aus zwei technischen Replikaten bestand. WT, Wildtyp Stamm L972.

Bei allen drei getesteten Introns der Gene *dbp2*, *srp54* und *prs5* können alle in der RIP verwendeten getaggtten spleißosomalen Proteine, sowie die getaggte Pol II mit einem signifikanten Unterschied zum Wildtyp (WT, Stamm L972) in der qRT-PCR nachgewiesen werden (Anhang: Tabelle 24, S. 144 + Tabelle 25, S. 145 + Tabelle 26, S. 146). Dabei ist auffällig, dass von den U1 snRNP Proteinen, U1-70K, U1A, U1C und U1H, bei allen drei Introns im 5'-Exon/5'-SS Bereich signifikant mehr zu finden ist als im BS/3'-SS Bereich. In Bezug auf die Proteine Bpb1 und Uaf2 ist zu sehen, dass von diesen bei den beiden Prp4-unabhängigen Introns, *dbp2* und *srp54*, im BS/3'-SS Bereich signifikant mehr detektiert wird als im 5'-Exon/5'-SS Bereich. Bei dem Prp4-abhängigen Intron, *prs5*, ist bei diesen Proteinen kein signifikanter Unterschied zu erkennen. Bei den U2 snRNP zugeordneten Proteinen, Lea1 und Msl1, und dem U5 snRNP Protein, Brr2, ist kein Unterschied zwischen dem 5'-Exon/5'-SS und BS/3'-SS Bereich des Introns festzustellen (Abbildung 10).

Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, dass im ersten Schritt der Intronerkennung *in vivo* als erstes die 5'-Exon/5'-SS durch den U1 snRNP erkannt wird. Anschließend lagert sich entweder das Spleißosom als Tetra-snRNP an oder der U2 snRNP koppelt sich zuerst an die 3'-Region des Introns und das restliche Spleißosom lagert sich danach als Tri-snRNP an. Das 3'-Ende des Introns wird vermutlich als erstes durch die beiden Proteine Bpb1 und Uaf2 erkannt.

2 Die Kinasen Prp4, Dsk1 und Lkh1 phosphorylieren SR Proteine und spleißosomale Proteine des U1 snRNPs

Die Ergebnissen der RIP mit anschließender qRT-PCR zeigten, dass die Intronerkennung zuerst an der 5'-Exon/5'-SS durch Anlagerung des U1 snRNPs stattfindet. Aus Mammalia ist bekannt, dass während der Intronerkennung Kinasen beteiligt sind, die durch Phosphorylierung Protein-Protein-Interaktionen ermöglichen (Cho et al., 2011). Aufgrund dessen wurden die Proteine des U1 snRNPs, die auch in der RIP getestet wurden (U1-70K, U1A, U1C und U1H), als potentielle neue *in vitro* Substrate der an der Intronerkennung beteiligten Kinasen Prp4, Dsk1 und Lkh1 geprüft. Außerdem wurden auch die drei Proteine Bpb1, Prp2 und Uaf2 und die SR Proteine, Srp1 und Srp2, sowie das SR-ähnliche Protein Rsd1 als potentielle Substrate überprüft. Einige dieser Proteine wurden schon zuvor als Substrate der beiden Kinasen Dsk1 und Lkh1 ermittelt (Tang et al., 1998; Tang et al., 2000; Tang et al., 2002; Tang et al., 2007; Lipp et al., 2015). Insbesondere sind potentielle neue Substrate der Prp4 Kinase interessant, da die Inhibition der Prp4 Kinase dazu führt, dass

transient prä-mRNA akkumuliert und das Intron nicht mehr erkannt wird (Eckert et al., 2016). Neu identifizierte *in vitro* Substrate der Prp4 Kinase könnten erste Hinweise geben, welche Proteine während der Intronerkennung phosphoryliert werden und somit mit der Prp4-Abhängigkeit in Verbindung stehen. Deswegen wurden in dieser Arbeit sowohl spleißosomale Proteine als auch Proteine, die nicht direkt mit dem Spleißosom assoziiert sind, im Kinaseassay eingesetzt. Des Weiteren wurden auch die bevorzugten Substrat Sequenzen der drei Kinasen *in vitro* durch synthetische Peptidbanken ermittelt. Damit werden *in silico* mögliche Phosphorylierungsstellen in potentiellen Substraten identifiziert, die dann experimentell weiter untersucht werden können (Hutti et al., 2004).

2.1 Prp4 Kinase phosphoryliert U1-70K, Bpb1, Srp2, und Rsd1 *in vitro*, während Dsk1 und Lkh1 viele Substrate phosphorylieren

Die für das *in vitro* Kinaseassay verwendeten Kinasen, Prp4, Dsk1 und Lkh1, sowie die potentiellen *in vitro* Substrate dieser Kinasen wurden als N-terminale GST-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert und anschließend über den GST-Tag mit Hilfe von Glutathion-Sepharose aufgereinigt. Anschließend wurden die Proteine durch die PreScission Protease, die zwischen dem GST-Tag und dem jeweiligen Protein schneidet, eluiert, sodass die Proteine ohne Tag für die Kinaseassays eingesetzt werden konnten.

Die Kinaseassays wurden mit den aufgereinigten Proteinen (Anhang: Abbildung 50, S. 148 + Abbildung 51, S. 149) und in Anwesenheit von γ [^{32}P] ATP durchgeführt. Die Detektion der phosphorylierten Proteine erfolgte, nach Auftrennung in einem 8 %igen bzw. 12 %igen SDS-Gel, über Autoradiographie. Die eingesetzten Mengen der Proteine und die Expositionszeiten des Films können Tabelle 27 (S. 147) entnommen werden.

Abbildung 11A zeigt das Autoradiogramm des Kinaseassays nach Auftrennung in einem 12 %igem SDS-Gel. Neben der autophosphorylierten Prp4 Kinase bei ca. 70 kDa (Spur 1-6) ist eine Bande bei ca. 34 kDa (Spur 2) zu erkennen, die dem phosphorylierten U1-70K des U1 snRNPs entspricht. Für alle anderen getesteten Proteine (U1A, U1C, Uaf2 und Srp1; Spur 3-6) mit Prp4 Kinase kann keine Phosphorylierung im Autoradiogramm detektiert werden. Im Kinaseassay mit Dsk1 können, neben der autophosphorylierten Kinase bei ca. 75 kDa (Spur 7-12), weitere Banden in Spur 8 bei ebenfalls ca. 34 kDa (U1-70K) und in Spur 12 im Bereich von 50 kDa bis 25 kDa (Srp1 und degradiertes Protein) detektiert werden. Die Proteine U1A, U1C und Uaf2 (Spur 9-11) werden nicht durch Dsk1 Kinase phosphoryliert. Für Lkh1 können im Kinaseassay neben der autophosphorylierten Lkh1 Kinase bei ca. 120 kDa (Spur 13-18) in Spur 14, 15 und 18 weitere Banden detektiert werden. In Spur 14 entspricht die Bande bei ca. 34 kDa dem phosphorylierten Protein U1-70K. Die Bande in Spur 15 bei ca. 35 kDa entspricht dem Protein U1A des U1 snRNPs und die Banden in Spur 18 im Bereich von 50 kDa bis 25 kDa entsprechen Srp1 und degradiertem Srp1. In

Abbildung 11B sind die gleichen Ansätze mit nicht-radioaktiv markiertem ATP aufgetragen, um die eingesetzten Mengen und Laufhöhen der Proteine nach Auftrennung in einem 12 %igen SDS-Gel und anschließender Coomassie-Färbung zu detektieren. Auffällig ist, dass Srp1 durch Dsk1 stark phosphoryliert wird und deswegen höher im Gel läuft, während es durch Lkh1 nur schwach phosphoryliert wird und niedriger läuft. Dies kann sowohl im Autoradiogramm als auch im SDS-Gel beobachtet werden (Abbildung 11, Spur 12 und 18).

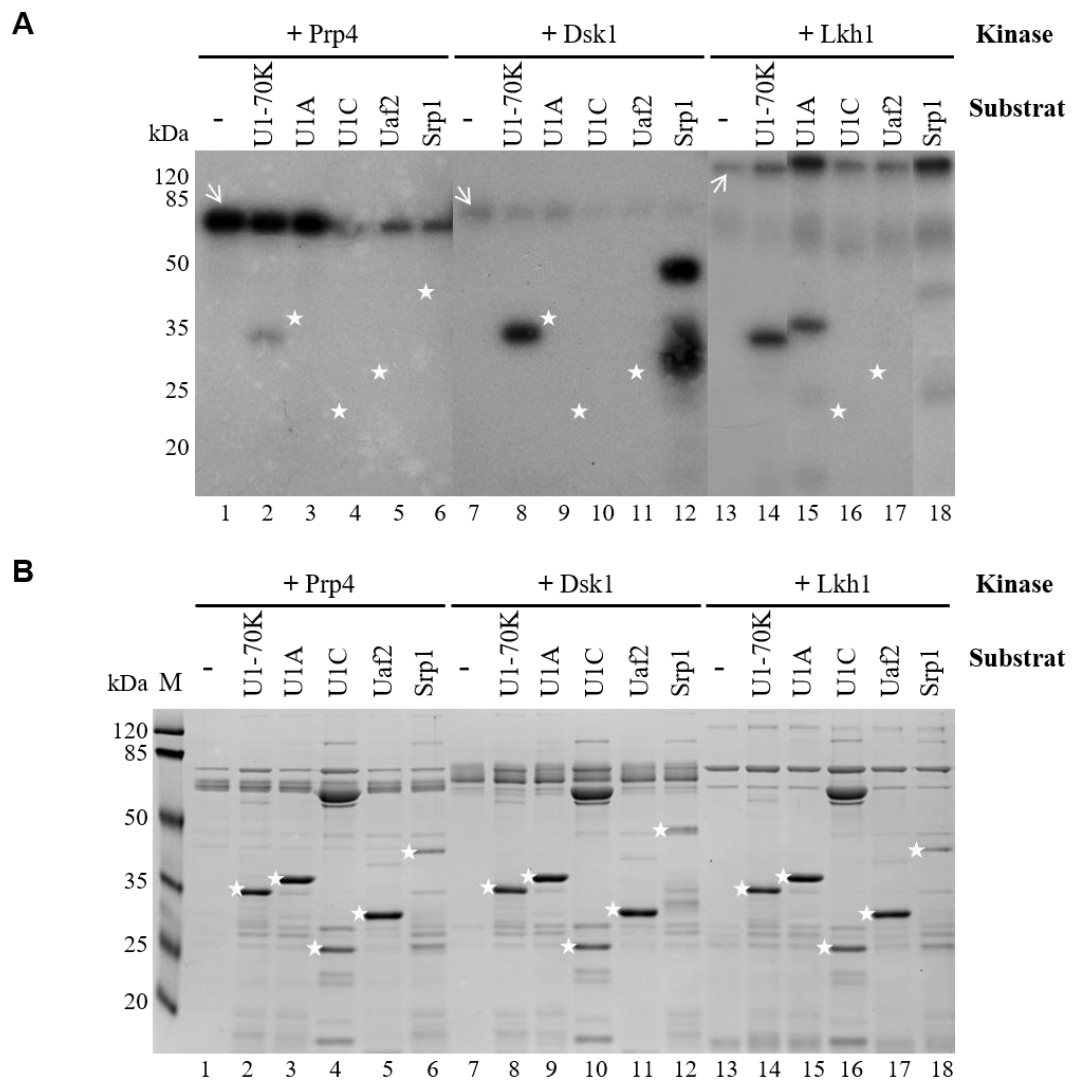


Abbildung 11| U1-70K ist ein *in vitro* Substrat von den Kinasen Prp4, Dsk1 und Lkh1, während Srp1 nur von Dsk1 und Lkh1 und U1A nur von Lkh1 phosphoryliert wird.

(A) Autoradiogramm des Kinaseassays nach Auftrennung in einem 12 %igen SDS-Gel. Sichtbar sind die Banden der Autophosphorylierung der Kinasen Prp4 (bei ca. 70 kDa), Dsk1 (bei ca. 75 kDa) und Lkh1 (bei ca. 120 kDa), die mit weißen Pfeilen gekennzeichnet ist. U1-70K (30 kDa) ist ein *in vitro* Substrat aller drei Kinasen, Srp1 (31 kDa) nur von Dsk1 und Lkh1 und U1A (28 kDa) nur von Lkh1. *, markiert die Position der zu erwartenden Bande; Links: Größenangaben des Standards in kDa. (B) Auftrennung der einzelnen Ansätze mit nicht-radioaktiv markiertem ATP in einem 12 %igen SDS-Gel. Die Laufhöhe der einzelnen Proteine kann abgelesen werden. Diese weichen von den tatsächlichen molekularen Größen in Tabelle 27 ab. *, markiert die Banden der Substrate; M, Größenstandard; Links: Größenangaben des Standards in kDa.

Abbildung 12A zeigt das Autoradiogramm des Kinaseassays nach Auftrennung in einem 8 %igem SDS-Gel. Neben der autophosphorylierten Prp4 Kinase bei ca. 70 kDa (Spur 1-6) sind weitere Bande in Spur 3 bei ca. 80 kDa, die phosphoryliertem Bpb1 entspricht, in Spur 5 bei ca. 55 kDa, die phosphoryliertem Srp2 entspricht, und in Spur 6 bei ca. 83 kDa, die phosphoryliertem Rsd1 entspricht, zu erkennen. U1H (Spur 2) und vermutlich Prp2 (Spur 4) werden nicht durch Prp4 Kinase phosphoryliert. Da Prp4 und Prp2 fast die gleiche molekulare Größe besitzen, kann Prp2 mit dieser Methode nicht endgültig als *in vitro* Substrat ausgeschlossen werden. Für Dsk1 können im Kinaseassay neben der autophosphorylierten Dsk1 Kinase bei ca. 75 kDa (Spur 7-12) in allen Spuren (8-12) weitere Banden detektiert werden. In Spur 8 entspricht die Bande bei ca. 85 kDa phosphoryliertem U1H, in Spur 9 entspricht die Bande bei ca. 80 kDa phosphoryliertem Bpb1, in Spur 10 entspricht die Bande bei ca. 68 kDa phosphoryliertem Prp2, in Spur 11 entspricht die Bande bei ca. 60 kDa phosphoryliertem Srp2 und in Spur 12 entspricht die Bande bei ca. 85 kDa phosphoryliertem Rsd1. Im Kinaseassay mit Lkh1 können ebenfalls neben der autophosphorylierten Kinase bei ca. 120 kDa (Spur 13-18) in allen Spuren (14-18) weitere Banden detektiert werden. In Spur 14 entspricht die Bande bei ca. 85 kDa dem phosphorylierten U1H, in Spur 15 entspricht die Bande bei ca. 80 kDa dem phosphorylierten Bpb1 und in Spur 16 entspricht die Bande bei ca. 68 kDa dem phosphorylierten Prp2. In Spur 17 sind zwei weitere Banden bei ca. 55 kDa und 60 kDa zu detektieren, die dem phosphorylierten Srp2 entsprechen, und in Spur 18 eine weitere Bande bei ca. 83 kDa, die dem phosphorylierten Rsd1 entspricht.

In Abbildung 12B sind die gleichen Ansätze mit nicht-radioaktiv markiertem ATP aufgetragen, um die eingesetzten Mengen und Laufhöhen der Proteine nach Auftrennung in einem 8 %igen SDS-Gel und anschließender Coomassie-Färbung zu detektieren. Auffällig ist, dass sowohl Srp2 als auch Rsd1 durch Dsk1 wiederum stark phosphoryliert werden und deswegen, im Vergleich zu den Ansätzen mit Prp4 (Spur 5 und 6) und Lkh1 (Spur 17 und 18), höher im Gel laufen (Spur 11 und 12). In dem Ansatz mit Lkh1 und Srp2 (Spur 17) sind interessanterweise zwei Banden bei ca. 55 kDa und 60 kDa zu detektieren, die phosphoryliertem Srp2 in zwei unterschiedlichen Phosphorylierungszuständen entsprechen. Dies kann sowohl im Autoradiogramm als auch im SDS-Gel beobachtet werden (Abbildung 12, Spur 5-6, 11-12 und 17-18).

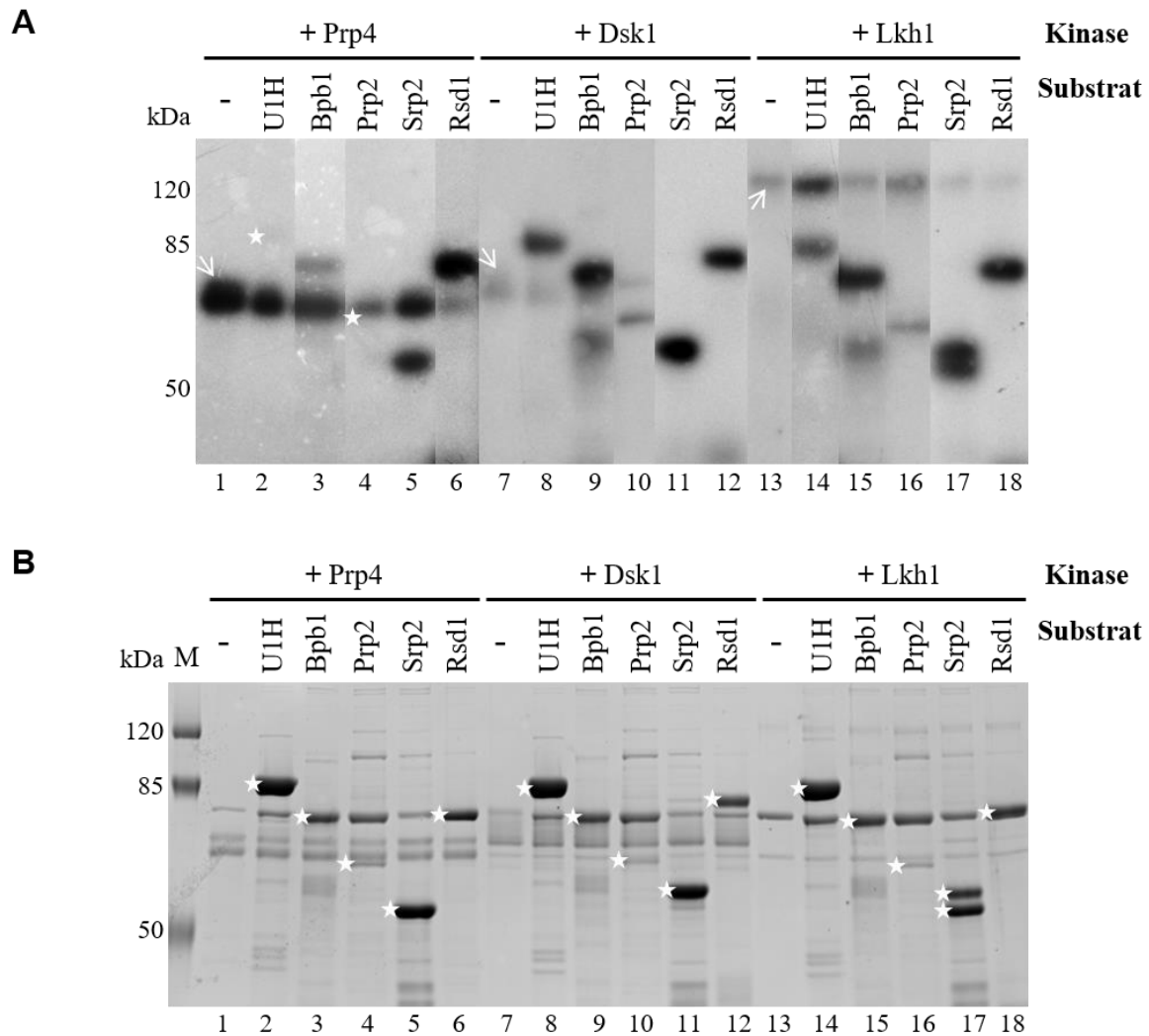


Abbildung 12| Bpb1, Srp2 und Rsd1 sind *in vitro* Substrate von den Kinasen Prp4, Dsk1 und Lkh1, während U1H und Prp2 nur von Dsk1 und Lkh1 phosphoryliert werden.

(A) Autoradiogramm des Kinaseassays nach Auftrennung in einem 8 %igem SDS-Gel. Sichtbar sind die Banden der Autophosphorylierung der Kinasen Prp4 (bei ca. 70 kDa), Dsk1 (bei ca. 75 kDa) und Lkh1 (bei ca. 120 kDa), die mit weißen Pfeilen gekennzeichnet ist. Bpb1 (64 kDa), Srp2 (43 kDa) und Rsd1 (69 kDa) sind *in vitro* Substrate aller drei Kinasen, U1H (81 kDa) und Prp2 (59 kDa) nur von Dsk1 und Lkh1. *, markiert die Position der zu erwartenden Bande; Links: Größenangaben des Standards in kDa. (B) Auftrennung der einzelnen Ansätze mit nicht-radioaktiv markiertem ATP in einem 8 %igem SDS-Gel. Die Laufhöhe der einzelnen Proteine kann abgelesen werden. Diese weichen von den tatsächlichen molekularen Größen in Tabelle 27 ab. *, markiert die Banden der Substrate; M, Größenstandard; Links: Größenangaben des Standards in kDa.

Insgesamt konnten durch die Kinaseassays U1-70K, Bpb1, Srp2 und Rsd1 als *in vitro* Substrate der Prp4 Kinase identifiziert werden. Die anderen beiden Kinasen, Dsk1 und Lkh1, phosphorylieren diese Proteine ebenfalls. Es konnten aber auch noch weitere *in vitro* Substrate dieser beiden Kinasen ermittelt werden. Dsk1 und Lkh1 phosphorylieren zusätzlich noch U1H, Prp2 und Srp1, und Lkh1 phosphoryliert ebenfalls noch U1A. Das spleißosomale Protein U1C und Uaf2 wurden mit dieser Methode nicht als *in vitro* Substrate der Kinasen identifiziert (Tabelle 2).

Tabelle 2| Übersicht der *in vitro* Substrate von Prp4, Dsk1 und Lkh1 Kinase

Protein	Substrat von Prp4?	Substrat von Dsk1?	Substrat von Lkh1?
U1-70K	ja	ja	ja
U1A	-	-	ja
U1C	-	-	-
U1H	-	ja	ja
Bpb1	ja	ja	ja
Prp2	(-)	ja	ja
Uaf2	-	-	-
Srp1	-	ja	ja
Srp2	ja	ja	ja
Rsd1	ja	ja	ja

2.2 Die Kinasen Prp4, Dsk1 und Lkh1 haben charakteristische Substrat-Sequenzen

Nachdem neue *in vitro* Substrate der drei Kinasen Prp4, Dsk1 und Lkh1 identifiziert wurden, stellte sich die Frage, ob die Serin/Threonin Kinasen die gleichen oder unterschiedlichen Serine/Threonine des Proteins phosphorylieren. Für diesen Ansatz wurden synthetische Peptidbanken verwendet, um die idealen Substrat-Sequenzen der Kinasen zu ermitteln. Dieser Versuch wurde in der Arbeitsgruppe von Lewis C. Cantley des Meyer Cancer Center, Department of Medicine des Weill Cornell Medical College (New York) von Jared L. Johnson durchgeführt. Dafür wurden die Kinasen Prp4, Dsk1 und Lkh1 in unserem Labor als N-terminale GST-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert und anschließend über den GST-Tag mit Hilfe von Glutathion-Sepharose aufgereinigt. Anschließend wurden die Proteine durch die PreScission Protease, die zwischen GST-Tag und dem jeweiligen Protein schneidet, eluiert, sodass die Kinasen ohne Tag verschickt und für die synthetischen Peptidbanken eingesetzt werden konnten. Die Kinasen wurden einmalig aufgereinigt und sowohl für die *in vitro* Kinaseassays im vorherigen Kapitel als auch für die synthetischen Peptidbanken verwendet. Die synthetischen Peptidbanken sind 198 verschiedene biotinylierte Substrat-Peptid-Mischungen, die jeweils an der zentralen Position 0 ein fixiertes Serin/Threonin enthalten und eine zusätzlich definierte Aminosäure, die an den flankierenden Positionen -5 bis +4 fixiert ist, während die restlichen Positionen degeneriert sind. Die einzelnen Peptidbanken wurden *in vitro* mit der rekombinanten Kinase und γ [^{32}P] ATP inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf eine mit Avidin/Streptavidin beschichteten Membran überführt und durch einen Phosphorimager sichtbar gemacht.

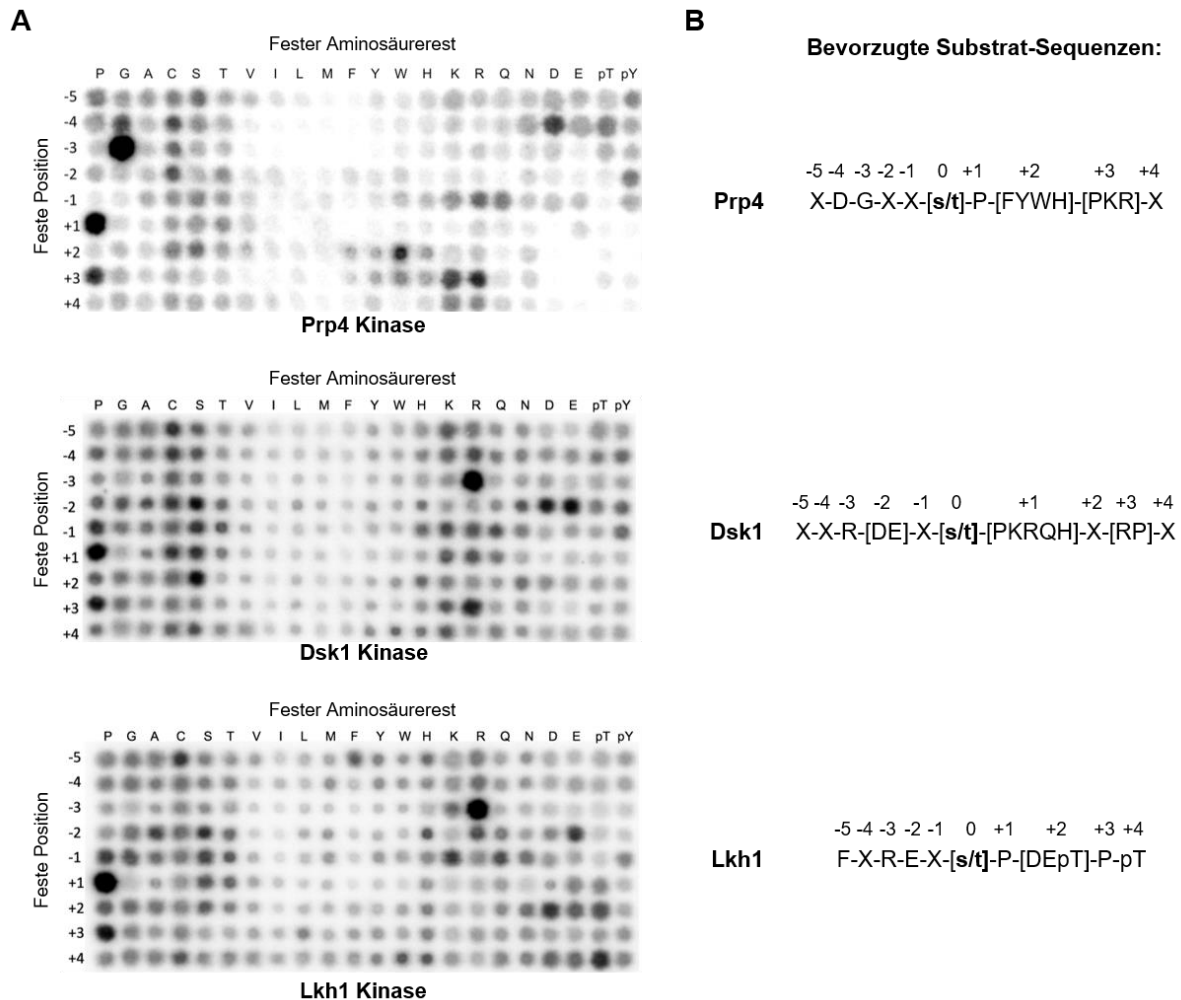


Abbildung 13| Die drei Kinasen Prp4, Dsk1 und Lkh1 haben charakteristische Substrat-Sequenzen

(A) Ergebnisse der synthetischen Peptidbanken für die Kinasen Prp4, Dsk1 und Lkh1. Individuelle *in vitro* Kinaseassays wurden mit rekombinanter Prp4, Dsk1 und Lkh1 Kinase und zufälligen synthetischen Serin/Threonin Peptidbanken, bestehend aus 198 Substrat-Peptid-Mischungen durchgeführt. Links: angegebene feste Position. Oben: Fester Aminosäurerest (B) Bevorzugte Substrat-Sequenzen der drei Kinasen ermittelt durch Jared L. Johnson aus den Ergebnissen der synthetischen Peptidbank. X bedeutet keine Selektivität.

Die Ergebnisse der Peptidbanken (Abbildung 13A) zeigen, dass Prp4 Kinase ein Glycin an Position -3 bevorzugt. Außerdem zeigt Prp4 eine starke Präferenz für Prolin an Position +1. Sowohl Dsk1 als auch Lkh1 Kinase zeigen eine starke Präferenz für Prolin an Position +1 und für Arginin an Position -3. Insgesamt konnten als ideale Substrat-Sequenzen für Prp4 X-D-G-X-X-[s/t]-P-[FYWH]-[PKR]-X, für Dsk1 X-X-R-[DE]-X-[s/t]-[PKRQH]-X-[RP]-X und für Lkh1 F-X-R-E-X-[s/t]-P-[DEpT]-P-pT ermittelt werden (Abbildung 13B). Somit haben alle drei Kinasen charakteristische Substrat Spezifitäten. Dsk1 und Lkh1 zeigen die gleiche Konsensussequenz RXX[S/T]P. Prp4 hingegen zeigt als Konsensussequenz GXX[S/T]P.

3 Die Deletion von *srp1* und gleichzeitige Repression von *srp2* beeinflusst das Zellwachstum und führt zu einer Veränderung der Prp4 Kinase-Abhängigkeit im Spleißprozess

Nach den Ergebnissen des Kinaseassays ist Srp2 ein *in vitro* Substrat der Prp4 Kinase während Srp1 kein Substrat ist. Nun sollte überprüft werden, wie sich einzelne Introns bei Deletion von *srp1* und gleichzeitiger Repression von *srp2* in Bezug auf die Prp4 Kinase-Abhängigkeit verhalten. Auch wenn Srp1 kein Substrat der Prp4 Kinase ist, könnte das Fehlen dieses Proteins trotzdem einen Einfluss auf die Prp4 Kinase-Abhängigkeit zeigen, da bekannt ist, dass die beiden SR Proteine miteinander interagieren (Tang et al., 2002). SR Proteine aus Mammalia sind dafür bekannt als *trans*-agierende Spleißfaktoren mit Komponenten des Spleißosoms zu interagieren, um deren Bindung an die prä-mRNA zu stabilisieren (Graveley, 2000). Deswegen sollte in dieser Versuchsreihe untersucht werden, welchen Einfluss die Abwesenheit der SR Proteine auf die Intronerkennung in *S. pombe* hat.

Als Kontrollstamm wurde der Stamm 801 verwendet, der für die analog-sensitive Prp4 Kinase, *prp4-as2* im Originallokus, kodiert, die durch Zugabe des Inhibitors 1NM-PP1 gehemmt werden kann. In dem Stamm 1060 ist zusätzlich zu *prp4-as2* das nicht-essentielle Gen *srp1* deletiert. Der Stamm 1045 besitzt *prp4-as2*, das essentielle Gen *srp2* ist im Originallokus deletiert und in den *leu1*-Lokus unter der Kontrolle des *nmt81* Promotors integriert. Dieser Promotor kann durch Zugabe von Thiamin reprimiert werden. Der Stamm 1059 exprimiert *prp4-as2*, *srp1* ist deletiert und *srp2* ist im Originallokus deletiert und in den *leu1*-Lokus unter der Kontrolle des Thiamin-reprimierbaren *nmt81* Promotors integriert.

Die Stämme, die *srp2* unter dem Thiamin-reprimierbaren *nmt81* Promotor enthalten, wurden sowohl mit als auch ohne Zugabe von Thiamin untersucht. Dabei wurden die Vorkulturen immer ohne Thiamin-Zugabe über Nacht inkubiert. Die Hauptkultur wurde am nächsten Tag mit der jeweiligen Vorkultur angeimpft und anschließend aufgeteilt. Eine Hälfte wurde mit Thiamin versetzt die andere nicht. Beide Kulturen wurden über Nacht bei 30 °C inkubiert, sodass die Probennahme nach frühestens 16 Std. nach Thiaminzugabe gestartet wurde. Alle Ergebnisse ohne Thiaminzugabe sind im Anhang zu finden (Abbildung 52-54, S. 150-152).

In Bezug auf die Zellphysiologie hat die Deletion von *srp1* als nicht-essentielles Gen keinen Einfluss auf die Wachstumsrate von *S. pombe*. Der Stamm 1060 verhält sich wie der Kontrollstamm 801 und verdoppelt sich in etwa 2,5 Stunden. Er zeigt außerdem die typische Arretierung der Zellen für drei Stunden nach Zugabe des Inhibitors 1NM-PP1 und setzt mit der Teilung nach den drei Stunden fort (Abbildung 14, grün). Die Stämme, 1045 (rot) und 1059 (blau), zeigen ohne Thiaminzugabe ebenfalls das gleiche Wachstumsverhalten wie der Kontrollstamm 801 und eine Teilung findet in etwa 2,5 Std. statt (Anhang: Abbildung 52, S. 150). Bei Repression des *nmt81* Promotors und somit des essentiellen Gens *srp2* durch Thiamin teilt sich der Stamm 1045 (rot) deutlich langsamer. Die Zellen verdoppeln sich in

etwa 4 Stunden. Nach Zugabe von 1NM-PP1 arretieren die Zellen ebenfalls für drei Stunden und beginnen dann wieder mit der Teilung. Der Stamm 1059 (blau) hingegen hat die Teilung sowohl mit als auch ohne Zugabe des Inhibitors 1NM-PP1 vollständig eingestellt. Dadurch ist auch die zeitabhängige Arretierung der Zellen nach Zugabe von Inhibitor nicht mehr zu beobachten (Abbildung 14). Somit hat die Deletion von *srp1* und gleichzeitige Repression von *srp2* zur Folge, dass die Zellen ihre Teilung vollständig einstellen.

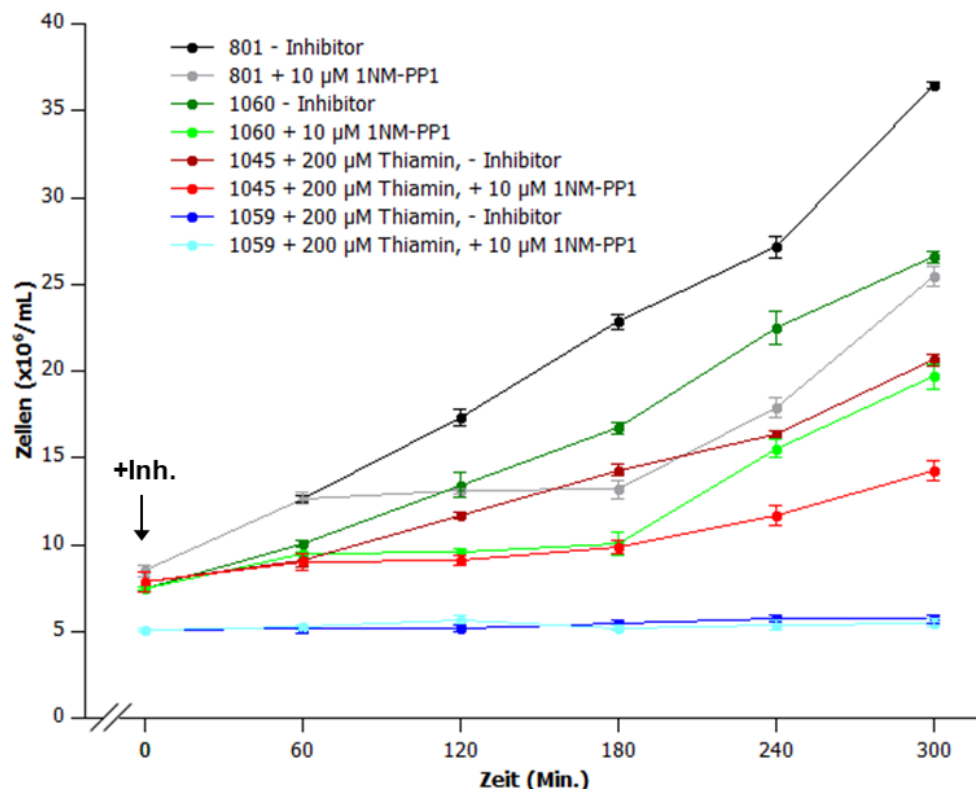


Abbildung 14| Die Abwesenheit der SR Proteine beeinflusst das Wachstumsverhalten der Zellen unterschiedlich

Das Wachstum der Stämme 801 (*prp4::int::prp4-as2-kan^R*) sowie 1060 (*prp4::int::prp4-as2-kan^R srp1::int::ura4 leu1-32*), 1045 (*prp4::int::prp4-as2-kan^R srp2::int::his7 leu1-32::int::pJKnmt81-srp2*) und 1059 (*prp4::int::prp4-as2-kan^R srp1::int::ura4 srp2::int::his7 leu1-32::int::pJKnmt81-srp2*) wurde ohne und mit Zugabe von 10 µM des Inhibitors 1NM-PP1 bei 30 °C untersucht. Außerdem wurde den Stämmen 1045 und 1059 200 µM Thiamin hinzugegeben, um den *nmf81* Promotor und somit das Protein Srp2 in diesen Zellen zu reprimieren. Als Kontrolle wurde der Stamm 801 betrachtet. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Inhibitorzugabe (+Inh.).

3.1 Die Prp4 Kinase-abhängigen Introns werden bei Deletion von *srp1* und gleichzeitiger Repression von *srp2* Prp4 Kinase-unabhängig gespleißt

Nach den Untersuchungen, ob und wie sich das Wachstumsverhalten der Zellen verändert, wenn *srp1* deletiert und/oder *srp2* reprimiert wurde, sollte nun der Einfluss der Deletion von *srp1* und/oder Repression von *srp2* auf das Spleißverhalten unterschiedlicher Introns, insbesondere in Bezug auf die Prp4-Abhängigkeit untersucht werden. Es wurden insgesamt fünf Introns durch semiquantitative RT-PCR analysiert. Aus vorherigen Versuchen ist

bekannt, dass drei der untersuchten Introns Prp4-abhängig und zwei Prp4-unabhängig gespleißt werden. Die drei Prp4-abhängigen Introns sind das Intron des Gens *res1*, das dritte Intron des Gens *tbp1* und das erste Intron des Gens *mrp17* (Abbildung 15). Die beiden Prp4-unabhängigen Introns sind das Intron des Gens *rpl29* und das zweite Intron des Gens *mrp17* (Abbildung 16). Die Introns wurden jeweils im Originalloкус der zuvor beschriebenen Stämme analysiert.

Das erste betrachtete Gen, das ein Prp4-abhängiges Intron besitzt, ist *res1* (Abbildung 15). Die RT-PCR Analyse zeigt, dass bei dem Stamm 801 ohne Inhibitorzugabe hauptsächlich mRNA mit einer Größe von 247 bp vorliegt. Wird 1NM-PP1 Inhibitor dazugegeben, akkumuliert schon nach 10 Min. prä-mRNA (374 bp). Nach 20 Min. wird dann fast ausschließlich die prä-mRNA Bande detektiert und die mRNA Bande verschwindet. Die Akkumulation von prä-mRNA und das Verschwinden von mRNA hält bis 90 Min. nach Inhibition an, wobei sich ab 120 Min. das Verhältnis von mRNA zu prä-mRNA erneut umkehrt. Nach 180 Min. wird dann überwiegend mRNA detektiert, was bedeutet, dass das Transkript wieder effizient gespleißt wird. Dies ist ein typisches Prp4 Kinase Spleiß-Inhibitionsmuster. Ist *srp1* deletiert (Stamm 1060) zeigt sich ein ähnliches Spleiß-Inhibitionsmuster. Bereits 10 Min. nach Inhibitorzugabe ist eine starke Akkumulation von prä-mRNA und das Verschwinden der mRNA Bande zu sehen. Nach 90 Min. hat sich das Verhältnis von mRNA zu prä-mRNA fast vollständig umgekehrt, es wird überwiegend mRNA detektiert und Spleißen findet wieder statt. Ist hingegen *srp2* reprimiert, ist die Ausprägung und Dauer der Akkumulation von prä-mRNA nach Inhibitorzugabe beeinflusst (Stamm 1045). Nach 10 Min. ist nur eine schwache Akkumulation von prä-mRNA zu sehen, die bis etwa 30 Min. anhält. Die mRNA Bande verschwindet nicht vollständig. Nach 60 Min. findet Spleißen wieder statt, was bedeutet, dass zu diesem Zeitpunkt überwiegend mRNA detektiert wird. Ist *srp1* deletiert und *srp2* reprimiert (Stamm 1059), wird kein typisches Spleiß-Inhibitionsmuster gefunden. Es wird zu allen Zeitpunkten überwiegend mRNA detektiert, was bedeutet, dass *res1* unter diesen Bedingungen auch nach Zugabe des Inhibitors gespleißt wird (Abbildung 15).

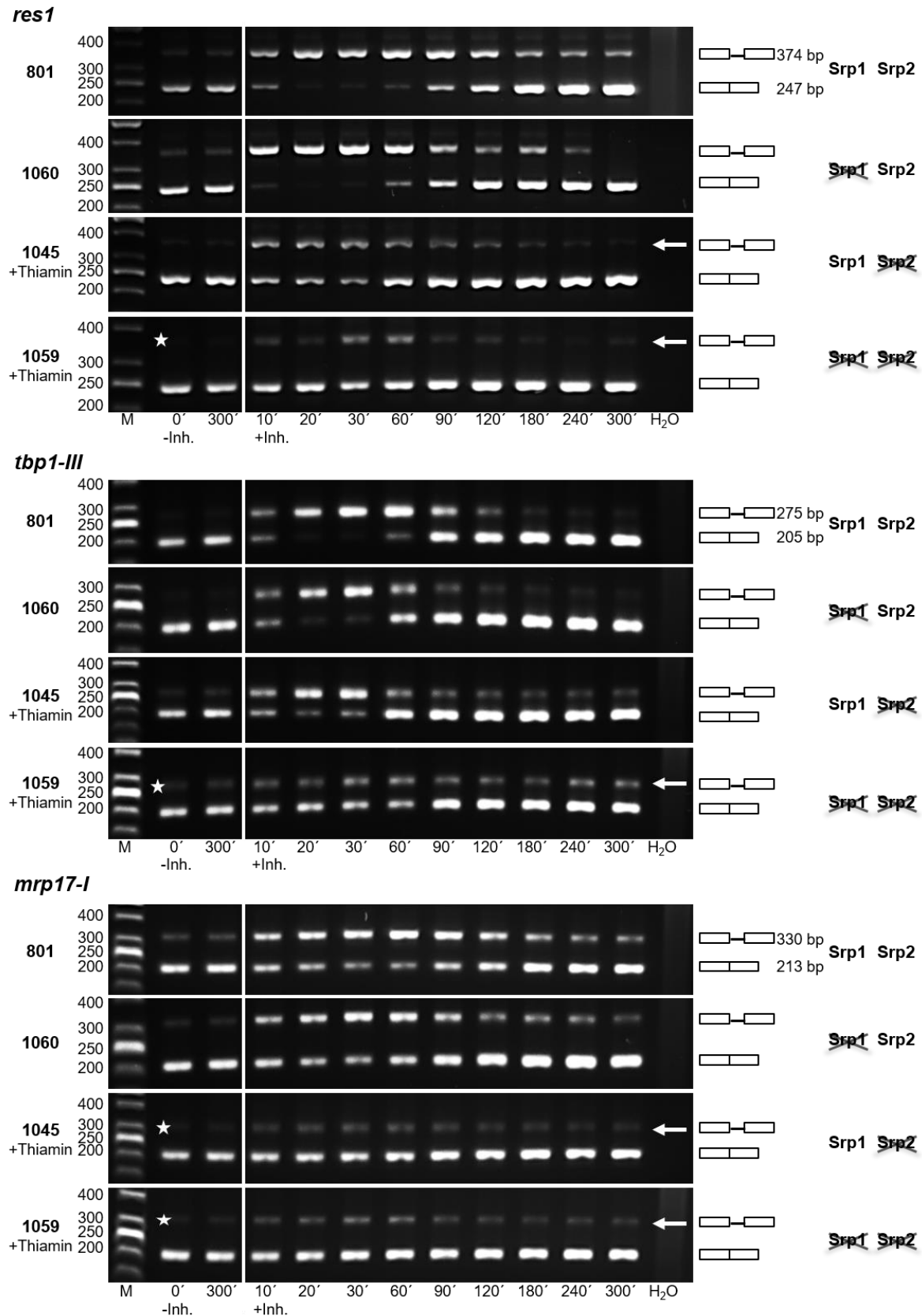


Abbildung 15| Die RT-PCR Analyse zeigt bei den Prp4-abhängigen Introns von *res1*, *tbp1-III* und *mrp17-I*, dass sowohl die Ausprägung als auch die Dauer der Akkumulation von prä-mRNA nach Inhibition der Prp4 Kinase durch die Deletion von *srp1* und Repression von *srp2* beeinflusst wird

Ohne Zugabe von Inhibitor (0', 300', -Inh.) wird bei allen drei Genen hauptsächlich mRNA amplifiziert. Während bei dem Stamm 801 von 10' bis 90' nach Zugabe von Inhibitor (+Inh., 10 µM 1NM-PP1) bei allen drei Genen überwiegend prä-

II Ergebnisse

mRNA detektiert wird, ist bei den Stämmen 1060 und 1045 (+ 200 μ M Thiamin) die Dauer und Ausprägung der Akkumulation von prä-mRNA nach Inhibitorzugabe bei allen drei Introns beeinflusst. Bei dem Stamm 1059 (+ 200 μ M Thiamin) wird bei allen drei Introns ausschließlich mRNA amplifiziert. *, markiert die Position des zu erwartenden prä-mRNA Fragments; M, Größenstandard; Pfeil: zeigt, dass die Stärke der Akkumulation von prä-mRNA beeinflusst ist; Rechts: schematische Darstellung von prä-mRNA sowie mRNA mit den zu erwartenden Fragmentgrößen und die An- bzw. Abwesenheit der SR Proteine. Links: Stammmummern und Größenangaben des Standards; H₂O, Kontrollreaktion ohne RNA als Template. Bei Genen mit mehreren Introns werden die Introns mit römischen Zahlen nummeriert.

Tbp1, das zweite betrachtete Gen, besitzt drei Introns, wobei das dritte Prp4-abhängige Intron betrachtet wird. Die RT-PCR Analyse zeigt auch bei diesem Intron, bei dem Stamm 801 das bekannte Spleiß-Inhibitions muster. Prä-mRNA akkumuliert nach Inhibitorzugabe für 60 Min. bevor sich das Verhältnis von mRNA zu prä-mRNA nach 90 Min. wieder umdreht und Spleißen stattfindet. Dieses Intron zeigt sowohl bei Deletion von *srp1* (Stamm 1060) als auch bei Repression von *srp2* (Stamm 1045) das zuvor beschriebene Spleiß-Inhibitions muster. Das Verhältnis von mRNA zu prä-mRNA hat sich allerdings bereits nach 60 Min. wieder umgedreht und das Intron wird effizient gespleißt. Fehlen wiederum beide SR Proteine in der Zelle (Stamm 1059) wird das Intron zu allen Zeitpunkten nach Inhibition gespleißt und es wird überwiegend mRNA detektiert (Abbildung 15).

Das dritte Gen ist *mrp17*. Bei diesem Gen wurden beide Introns durch RT-PCR betrachtet. Das erste, Prp4 Kinase-abhängige Intron zeigt bei dem Stamm 801 das bekannte Spleiß-Inhibitions muster. Nach Inhibition akkumuliert prä-mRNA und die mRNA Bande nimmt ab, das Verhältnis zwischen mRNA und prä-mRNA dreht sich nach 120 Min. wieder um und Spleißen findet statt. Ist *srp1* deletiert (Stamm 1060), ist das typische Spleiß-Inhibitions muster zu finden aber Spleißen findet bereits nach 90 Min. wieder statt. Bei diesem Intron hat schon die Repression von *srp2* (Stamm 1045) den gleichen Einfluss auf das Spleißverhalten wie in Stamm 1059, in dem *srp1* deletiert und *srp2* reprimiert ist. Beide Stämme zeigen nicht mehr das typische Spleiß-Inhibitionsverhalten. Es wird zu allen Zeitpunkten überwiegend mRNA detektiert und es findet keine Akkumulation von prä-mRNA nach Inhibition statt. Das bedeutet, dass das Intron zu allen Zeitpunkten gespleißt wird (Abbildung 15).

Als Kontrolle wurden außerdem die RT-PCRs der Stämme 1045 und 1059 auch ohne Thiaminzugabe analysiert. Unter diesen Bedingungen ist der *nmt81* Promotor aktiv. Deshalb sollte überprüft werden, ob die veränderte Transkriptionsrate des Gens *srp2* durch den aktiven *nmt81* Promotor die Prp4-Abhängigkeit beeinflusst. Die veränderte Transkriptionsrate des Gens *srp2* durch den aktiven *nmt81* Promotor hat keinen Einfluss auf die Prp4-Abhängigkeit. Die RT-PCRs der Stämme zeigen das typische Spleiß-Inhibitions muster (Anhang: Abbildung 53, S. 151).

Die beiden untersuchten Prp4-unabhängig gespleißten Introns der Gene *rpl29* und das zweite Intron von *mrp17*, werden weder durch die Deletion von *srp1* noch durch Repression

von *srp2* beeinflusst. Die RT-PCR Analyse von *rpl29* und *mrp17-II* zeigt, dass bei allen Stämmen und zu allen Zeitpunkten nach Inhibition von Prp4 Kinase überwiegend mRNA mit einer Größe von 129 bp bzw. 273 bp vorliegt und keine Akkumulation von prä-mRNA stattfindet (Abbildung 16). Als Kontrolle wurden auch diese Stämme wieder ohne Thiaminzugabe untersucht. Auch da werden die beiden Introns Prp4-unabhängig gespleißt (Anhang: Abbildung 54, S. 152).

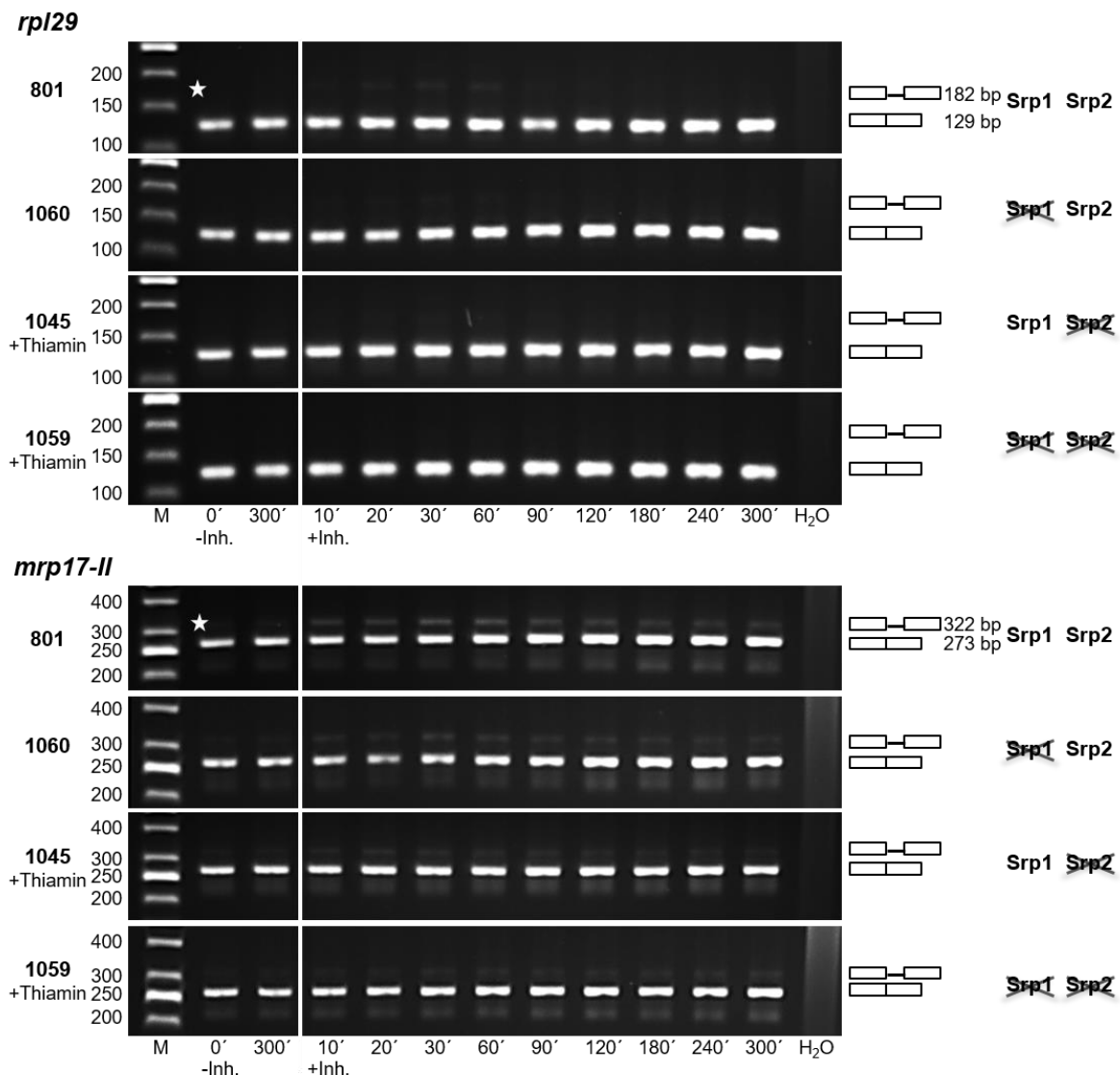


Abbildung 16| Die RT-PCR Analyse zeigt bei den Prp4-unabhängigen Introns von *rpl29* und *mrp17-II*, dass die Deletion von *srp1* und Repression von *srp2* die Prp4-Unabhängigkeit nicht verändert

Sowohl ohne Zugabe von Inhibitor (0', 300', -Inh.) als auch nach Zugabe von Inhibitor (+Inh.) wird bei allen Genen hauptsächlich mRNA amplifiziert. Es findet bei keinem der untersuchten Stämme eine Akkumulation von prä-mRNA statt. *, markiert die Position des zu erwartenden prä-mRNA Fragments; M, Größenstandard; Rechts: schematische Darstellung von prä-mRNA sowie mRNA mit den zu erwartenden Fragmentgrößen und die An- bzw. Abwesenheit der SR Proteine. Links: Stammnummern und Größenangaben des Standards; H₂O, Kontrollreaktion ohne RNA als Template. Bei Genen mit mehreren Introns werden die Introns mit römischen Zahlen nummeriert.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass das Fehlen von Srp1 und Srp2 unter keiner der gewählten Konditionen das Spleißen der Prp4-unabhängigen Introns beeinträchtigt. Bei den Prp4-abhängigen Introns beeinflusst die Deletion von *srp1* die Dauer der Akkumulation von prä-mRNA. Das Verhältnis von mRNA zu prä-mRNA dreht sich, im Vergleich zu dem Kontrollstamm 801, bei allen untersuchten Introns 30 Min. schneller wieder um (Abbildung 15, S. 33). Die Repression von *srp2* hat unterschiedliche Einflüsse auf die Prp4-Abhängigkeit. Bei den untersuchten Introns wird entweder die Dauer der Akkumulation von prä-mRNA verkürzt, die Stärke der Akkumulation von prä-mRNA verringert und gleichzeitig verschwindet die mRNA Bande nicht komplett oder es findet keine Akkumulation von prä-mRNA nach Inhibition statt und es wird zu allen Zeitpunkten überwiegend mRNA detektiert (Abbildung 15, S. 33). Bei der Deletion von *srp1* und Repression von *srp2* zeigen alle untersuchten Introns kein typisches Spleiß-Inhibitionsmuster mehr. Es wird zu allen Zeitpunkten nach Inhibition der Prp4 Kinase überwiegend mRNA detektiert und es findet keine Akkumulation von prä-mRNA mehr statt. Das bedeutet, dass die Introns zu allen Zeitpunkten gespleißt werden (Abbildung 15, S. 33).

3.2 Die RNA-Sequenzierung bestätigt, dass das Fehlen der beiden SR Proteine bei fast allen Introns zu Prp4 Kinase-Unabhängigkeit führt

Nach den Ergebnissen der semiquantitativen RT-PCRs sollte nun überprüft werden, ob die Deletion von *srp1* und gleichzeitige Repression von *srp2* bei allen Introns aus *S. pombe* zu Prp4-unabhängig gespleißten Introns führt und als Folge die beiden Intronklassen nicht mehr existieren. Um die Gesamtheit der Introns betrachten zu können, wurde eine RNA-Sequenzierung (RNA-Seq) in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. José Ayté an der Universität Pompeu Fabra (Barcelona) durchgeführt. Es wurden insgesamt sechs verschiedene experimentelle Bedingungen gewählt und miteinander verglichen, wobei der Stamm 1059 verwendet wurde. Dieser kodiert, wie zuvor beschrieben, für die analog-sensitive Prp4 Kinase, die durch Zugabe des Inhibitors 1NM-PP1 gehemmt werden kann, außerdem ist *srp1* deletiert und *srp2* ist unter der Kontrolle des *nmt81* Promotors regulierbar. Dieser Promotor kann durch Zugabe von Thiamin reprimiert werden. Die ersten drei Bedingungen waren ohne Zugabe von Thiamin und ohne Zugabe des Inhibitors, sowie 30 und 60 Min. nach Zugabe von 1NM-PP1. Dieselben Bedingungen wurden nach Zugabe von Thiamin untersucht. Diese Ergebnisse wurden dann mit den ermittelten RNA-Seq Ergebnissen des Stammes 801, der nur die analog-sensitive Prp4 Kinase kodiert, verglichen.

Bei der bioinformatischen Auswertung wurde der *Relative Splicing Efficiency Index* (RSEI) der einzelnen Introns bestimmt, um eine Einordnung in die beiden Intronklassen zu ermöglichen. Der RSEI-Wert wurde für die einzelnen experimentellen Bedingungen folgendermaßen berechnet:

$$\text{RSEI} = \log_2 \frac{(\text{Anzahl gesplei\ss te Transkripte} + 1)}{(\text{Anzahl ungesplei\ss te Transkripte} + 1)}$$

Introns, bei denen nach Inhibition der Kinase mehr gesplei\ss te als ungesplei\ss te Transkripte gefunden werden und diese somit einen positiven RSEI-Wert besitzen, geh\u00f6ren zur Klasse der Prp4-unabh\u00e4ngigen Introns. Im Gegensatz dazu zeigen die Prp4-abh\u00e4ngigen Introns einen negativen RSEI-Wert, was bedeutet, dass mehr pr\u00e4-mRNA als mRNA gefunden wird. Werden die Ergebnisse im Detail betrachtet zeigt sich, dass von etwa 5300 Introns in proteinkodierenden Genen in *S. pombe* (Wood et al., 2012), die in diesem Projekt ermittelten Sequenzen eindeutig 4267 Introns in 2128 Genen zugeordnet werden k\u00f6nnen. F\u00fcr diese Introns wurden zu jedem untersuchten Zeitpunkt und unter allen Bedingungen mindestens zehn Sequenzen ermittelt, sodass ein RSEI-Wert bestimmt werden konnte.

In Abbildung 17 sind H\u00e4ufigkeitshistogramme dargestellt, in denen die Anzahl der Introns den jeweiligen RSEI-Werten ohne, sowie 30 und 60 Min. nach Inhibitorzugabe zugeordnet wurden. F\u00fcr den Stamm 801, der als Referenz diente und in dem sowohl Srp1 als auch Srp2 in der Zelle vorliegen, wurden zuvor zwei Intronklassen, Prp4-abh\u00e4ngige und -unabh\u00e4ngige Introns, gefunden. Ohne Inhibitorzugabe liegt f\u00fcr alle untersuchten Introns ein positiver RSEI-Wert vor. W\u00e4hrend f\u00fcr 71,7 % der Introns 30 und 60 Min. nach Inhibition weiterhin ein positiver RSEI-Wert vorliegt und diese Prp4-unabh\u00e4ngig gesplei\ss t werden, zeigen 28,3 % der Introns einen negativen RSEI-Wert und werden Prp4-abh\u00e4ngig gesplei\ss t (Abbildung 17, A; (Eckert et al., 2016)).

F\u00fcr den Stamm 1059 liegt ebenfalls f\u00fcr alle untersuchten Introns ohne Zugabe von Thiamin und des Inhibitors ein positiver RSEI-Wert vor. Unter diesen Bedingungen ist *srp1* deletiert w\u00e4hrend Srp2 in der Zelle vorliegt. Bei 30 und 60 Min. nach Inhibition k\u00f6nnen die Introns anhand der RSEI-Werte wiederum in die zwei Intronklassen eingeordnet werden. Bei 71,7 % bzw. 87,3 % der Introns liegt ein positiver RSEI-Wert vor. Diese werden somit Prp4-unabh\u00e4ngig gesplei\ss t. W\u00e4hrend 28,3 % bzw. 12,7 % der Introns einen negativen RSEI-Wert zeigen. Diese Introns werden in die Klasse der Prp4-abh\u00e4ngigen Introns eingeordnet. Im Gegensatz dazu zeigen bei Zugabe von Thiamin und vor Inhibition der Kinase nur 98,1 % der Introns einen positiven RSEI-Wert. Die restlichen Introns haben zu diesem Zeitpunkt bereits einen negativen RSEI-Wert. Bei 30 und 60 Min. nach Inhibition zeigen 3,7 % bzw. 3 % der Introns einen negativen RSEI-Wert w\u00e4hrend die restlichen Introns weiterhin einen positiven RSEI-Wert aufweisen. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass bei Deletion von *srp1* und gleichzeitiger Repression von *srp2* mehr als 95 % der Introns Prp4-unabh\u00e4ngig gesplei\ss t werden (Abbildung 17, B).

II Ergebnisse

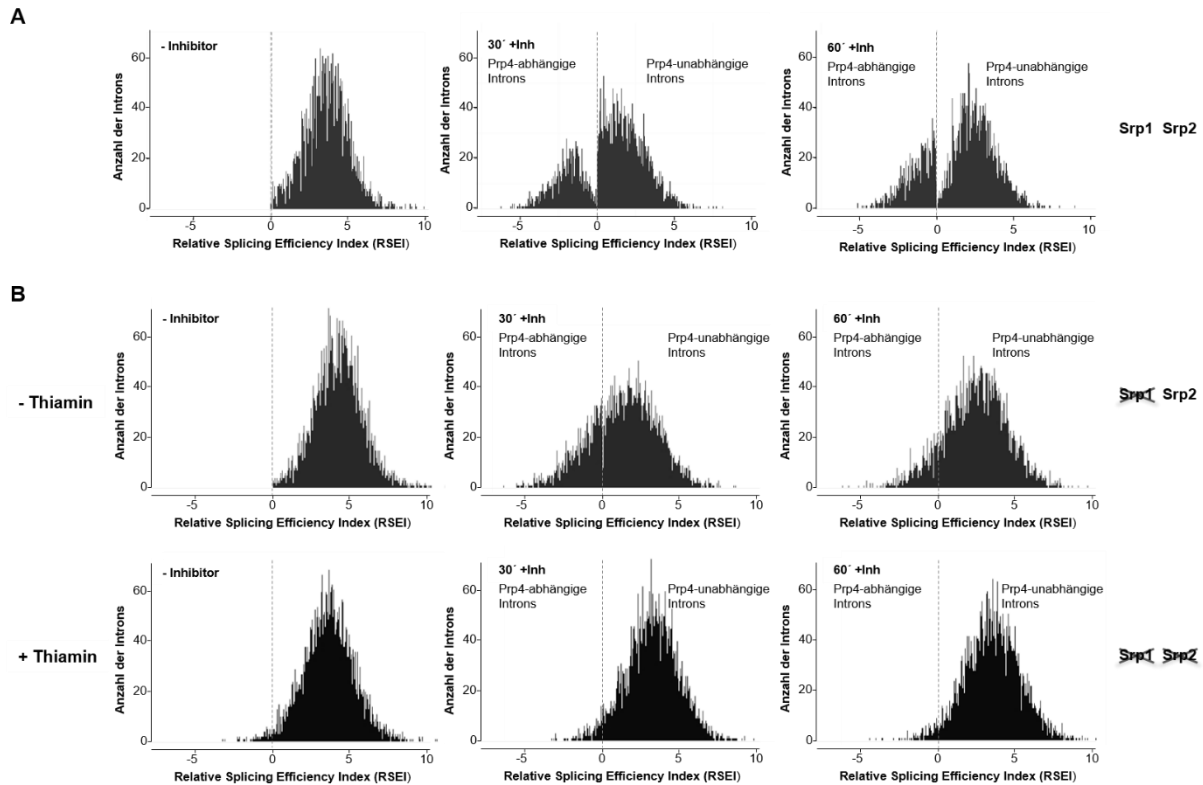


Abbildung 17| Das Häufigkeitshistogramm zeigt, dass bei Abwesenheit der SR Proteine Srp1 und Srp2 fast alle Introns unabhängig von der Aktivität der Prp4 Kinase gespleißt werden

Die Anzahl der Introns wurde dem jeweiligen Relative Splicing Efficiency Index (RSEI)-Wert zugeordnet. (A) Dabei wurden für den Stamm 801 bei 30 und 60 Min. nach Inhibition (+Inh, 10 μ M 1NM-PP1) zwei Intronklassen gefunden. Die Prp4-unabhängigen zeigen einen positiven RSEI, während die Prp4-abhängigen Introns einen negativen RSEI-Wert aufweisen (Eckert et al., 2016). (B) Für den Stamm 1059 wurden bei Deletion von *srp1* (-Thiamin) weiterhin 30 und 60 Min. nach Inhibition (+Inh, 10 μ M 1NM-PP1) zwei Intronklassen gefunden. Die Prp4-unabhängigen Introns zeigen einen positiven und die Prp4-abhängigen einen negativen RSEI-Wert. Bei gleichzeitiger Repression von *srp2* (+ 200 μ M Thiamin) weisen etwa 2 % der Introns vor Inhibitorzugabe (-Inhibitor) einen negativen RSEI-Wert auf, wobei die restlichen Introns einen positiven Wert aufweisen. 30 und 60 Min. nach Inhibition (+Inh, 10 μ M 1NM-PP1) zeigen immer noch mehr als 95 % der Introns einen positiven RSEI-Wert.

Bei Deletion von *srp1* ist die Abhängigkeit von der Aktivität der Prp4 Kinase weiterhin intronspezifisch. Es gibt Gene, in denen alle Introns entweder Prp4-abhängig oder -unabhängig gespleißt werden, aber es gibt auch Gene, bei denen einige Introns Prp4-abhängig und andere Prp4-unabhängig gespleißt werden. Bei Deletion von *srp1* und gleichzeitiger Repression von *srp2* werden alle untersuchten Introns Prp4-unabhängig gespleißt. In Abbildung 18 sind für eine bessere Vergleichbarkeit die RT-PCRs der Gene *res1* und *mrp17* mit den zugehörigen RSEI-Werten (30', +Inh.) gezeigt. Für die RT-PCR wurden Primer verwendet, die in den angrenzenden Exons im Originalloкус binden, um die Introns jeweils einzeln in der RT-PCR zu untersuchen.

Das Gen *res1* besitzt ein Intron von 127 bp mit einem negativen RSEI-Wert, das Prp4-abhängig gespleißt wird, auch wenn *srp1* deletiert ist (-Thiamin). Ohne Inhibition der Kinase wird das Intron effizient gespleißt aber 10 und 30 Min. nach Inhibitorzugabe akkumuliert prä-mRNA und die mRNA Menge verringert sich. Bei Deletion von *srp1* und

gleichzeitiger Repression von *srp2* (+Thiamin) ist zu allen untersuchten Zeitpunkten, mit und ohne Inhibition, die gleiche Menge an mRNA zu detektieren und es zeigt sich nur ein Hauch von prä-mRNA nach Inhibition. Somit wird das Intron zu allen Zeitpunkten Prp4-unabhängig gespleißt und besitzt einen positiven RSEI-Wert (Abbildung 18, A).

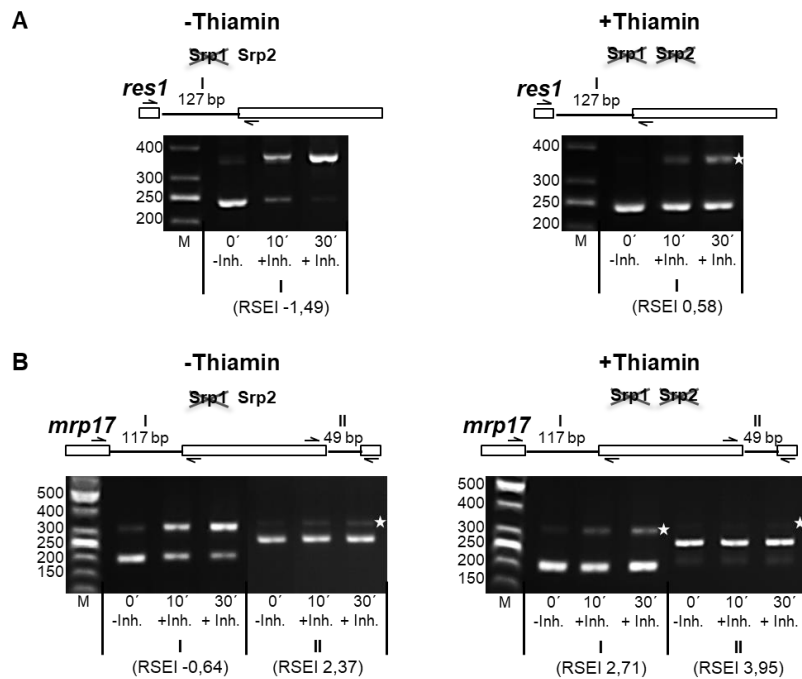


Abbildung 18| Die bei Deletion von *srp1* weiterhin intronspezifisch Prp4-abhängig gespleißten Introns der Gene *res1* und *mrp17* werden bei gleichzeitiger Deletion von *srp1* und Repression von *srp2* Prp4-unabhängig gespleißt

Alle Gene sind oberhalb der Agarosegel Bilder schematisch dargestellt und die verwendeten Primer, sowie Introngrößen eingezeichnet. Unterhalb sind die RSEI-Werte der einzelnen Introns angegeben. Die Introns sind in 5'-3' Richtung mit römischen Zahlen nummeriert. Links befinden sich die Fragmentgrößen des Standards. *, erwartete Größe der prä-mRNA; M, Marker. (A) Die RT-PCR Analyse des Introns von *res1* zeigt bei alleiniger Deletion von *srp1* (-Thiamin) ohne Inhibition (-Inh.) hauptsächlich mRNA. Nach Inhibition (10' und 30', + Inh.) kann hauptsächlich prä-mRNA detektiert werden. Bei Deletion von *srp1* und gleichzeitiger Repression von *srp2* (+Thiamin) wird das Intron Prp4-unabhängig gespleißt. (B) Die Introns von *mrp17* zeigen bei alleiniger Deletion von *srp1* (-Thiamin) ohne Inhibition (-Inh.) hauptsächlich mRNA. Nach Inhibition (10' und 30', + Inh.) kann beim ersten Intron hauptsächlich prä-mRNA detektiert werden, während das zweite Intron weiterhin gespleißt wird. Bei Deletion von *srp1* und gleichzeitiger Repression von *srp2* (+Thiamin) werden beide Introns Prp4-unabhängig gespleißt.

Das Gen *mrp17* besitzt zwei Introns. Das erste, 117 bp große, Intron wird Prp4-abhängig und das zweite, 49 bp große, Prp4-unabhängig gespleißt, auch wenn *srp1* deletiert ist (-Thiamin). Bei Betrachtung der RT-PCR ist 10 und 30 Min. nach Inhibitorzugabe deutlich die Akkumulation von prä-mRNA und Abnahme der mRNA bei Intron I zu erkennen. Bei Intron II bleibt die mRNA Menge konstant und es kann nach Inhibition nur ein Hauch von prä-mRNA gefunden werden. Dementsprechend besitzt Intron I einen negativen und Intron II einen positiven RSEI-Wert. Bei Deletion von *srp1* und gleichzeitiger Repression von *srp2* (+Thiamin) ist sowohl bei Intron I als auch bei Intron II zu allen untersuchten Zeitpunkten, mit und ohne Inhibition, die gleiche Menge an mRNA zu detektieren und es zeigt sich nur ein

Hauch von prä-mRNA nach Inhibition. Somit werden beide Introns Prp4-unabhängig gespleißt und weisen einen positiven RSEI-Wert auf (Abbildung 18, B).

Zusammen mit den Daten der RNA-Sequenzierung zeigen diese Ergebnisse, dass bei Deletion von *srp1* die beiden Intronklassen weiterhin existieren und es intronspezifisch ist, ob die Aktivität der Kinase benötigt wird, um das Intron zu spleißen. Bei Deletion von *srp1* und gleichzeitiger Repression von *srp2* weisen fast alle Introns einen positiven RSEI-Wert auf und die Aktivität der Kinase wird nicht mehr benötigt, damit die Introns gespleißt werden. Die Aufteilung in die beiden Intronklassen kann nicht mehr gefunden werden.

4 Die gleichzeitige Deletion der Kinasen Dsk1 und Lkh1 beeinflusst das Zellwachstum und führt zu einer Veränderung der Prp4 Kinase-Abhängigkeit im Spleißprozess

Die oben beschriebenen Untersuchungen ergaben, dass alle *in vitro* Substrate der Prp4 Kinase auch von den beiden nicht-essentiellen Kinasen, Dsk1 und Lkh1, *in vitro* phosphoryliert werden (Abbildung 11, S. 25 + Abbildung 12, S. 27). Deshalb sollte nun überprüft werden, ob die Deletion dieser Kinasen *in vivo* einen Einfluss auf die Prp4-Abhängigkeit beim Spleißen hat. Dabei sollte sowohl der Einfluss der Deletion von *dsk1* oder *lkh1*, als auch der Einfluss der Deletion beider Kinasen untersucht werden. In vorherigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass beide Kinasen die Interaktion der beiden SR Proteine durch Phosphorylierung *in vitro* beeinflussen (Tang et al., 2002). Außerdem wurde in den vorherigen Kapiteln gezeigt, dass die Abwesenheit der beiden SR Proteine von Prp4-Abhängigkeit zu Prp4-Unabhängigkeit führt. Somit könnte die Deletion der beiden Kinasen und eine daraus resultierende fehlende Phosphorylierung der beiden SR Proteine die Prp4-Abhängigkeit beeinflussen.

Als Kontrollstamm wurde der Stamm 801 verwendet, der für die analog-sensitive Prp4 Kinase, *prp4-as2* im Originalloкус, kodiert, die durch Zugabe des Inhibitors 1NM-PP1 gehemmt werden kann. In dem Stamm 1105 ist außerdem das nicht-essentielle Gen *dsk1* deletiert, während in Stamm 1179 das nicht-essentielle Gen *lkh1* deletiert ist. Es wurde auch der Stamm 1176 verwendet, der *prp4-as2* exprimiert und in dem beide Gene, *dsk1* und *lkh1*, deletiert sind.

Weder die Deletion von *dsk1* noch die von *lkh1* hat einen Einfluss auf die Wachstumsrate von *S. pombe* (Abbildung 19). Der Stamm 1105 (grün) und der Stamm 1179 (rot) zeigen ein Wachstumsverhalten wie der Kontrollstamm 801, der sich in etwa 2,5 Stunden verdoppelt. Beide Stämme zeigen die typische Arretierung der Zellen für drei Stunden nach Zugabe von Inhibitor und setzen dann mit der Teilung fort. Bei Deletion von *dsk1* und *lkh1* teilt sich der Stamm 1176 (blau) deutlich langsamer. Die Zellen verdoppeln sich in etwa 4,5 Stunden. Nach Zugabe von Inhibitor arretieren die Zellen ebenfalls für drei Stunden und beginnen

dann wieder mit der Teilung (Abbildung 19). Somit zeigt nur eine gleichzeitige Deletion von *dsk1* und *lkh1* einen Einfluss auf die Wachstumsrate der Zellen.

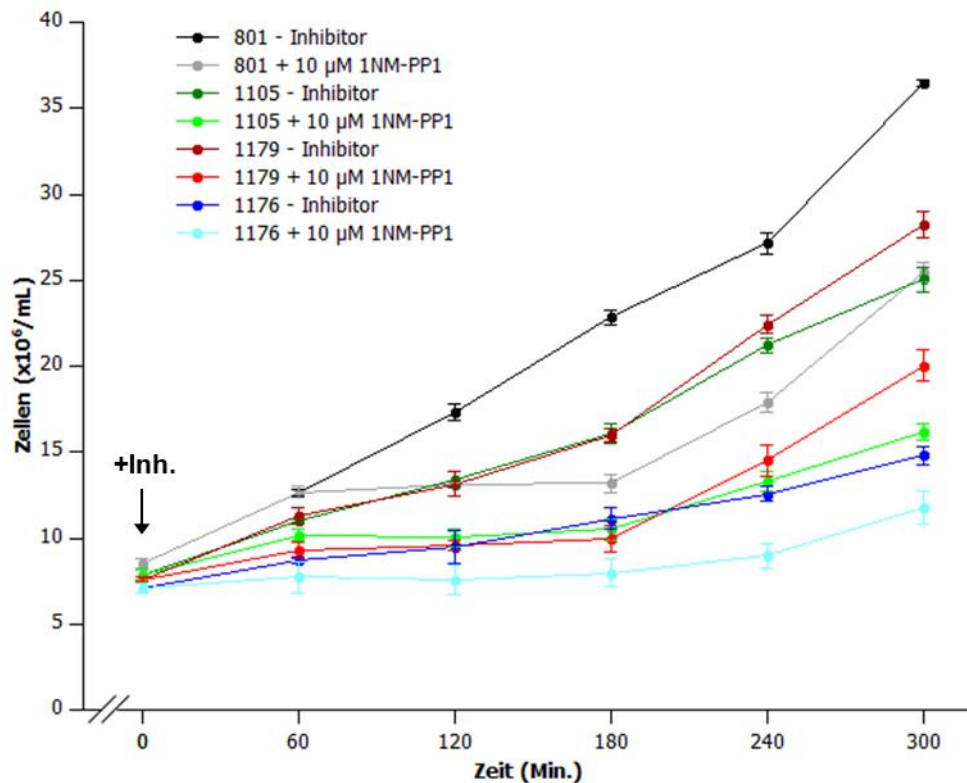


Abbildung 19| Die Deletion der nicht-essentiellen Kinasen Dsk1 und Lkh1 beeinflusst das Wachstumsverhalten der Zellen

Das Wachstum der Stämme 801 (*prp4:int::prp4-as2-kan^R*) sowie 1105 (*prp4:int::prp4-as2-kan^R dsk1:int::ura4*), 1179 (*prp4:int::prp4-as2-kan^R lkh1:int::ura4*) und 1176 (*prp4:int::prp4-as2-kan^R dsk1:int::ura4 lkh1:int::ura4*) wurde ohne und mit Zugabe von 10 µM des Inhibitors 1NM-PP1 bei 30 °C untersucht. Als Kontrolle wurde der Stamm 801 betrachtet. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Inhibitorzugabe (+Inh.).

4.1 Die gleichzeitige Deletion der Kinase Dsk1 und Lkh1 führt bei den Prp4 Kinase-abhängigen Introns zu Prp4 Kinase-Unabhängigkeit

Nach den Untersuchungen, ob und wie sich das Wachstumsverhalten der Zellen verändert, wenn *dsk1* und/oder *lkh1* deletiert wurden, sollte nun der Einfluss der Deletion von *dsk1* und/oder *lkh1* auf das Spleißverhalten unterschiedlicher Introns, insbesondere in Bezug auf die Prp4-Abhängigkeit untersucht werden. Es wurden fünf Introns durch semiquantitative RT-PCR analysiert. Drei Prp4-abhängige Introns: das Intron des Gens *res1*, das dritte Intron des Gens *tbp1* und das erste Intron des Gens *mrp17* (Abbildung 20). Als zwei Prp4-unabhängige Introns wurden die des Gens *rp129* und das zweite Intron des Gens *mrp17* untersucht (Abbildung 21). Die Introns wurden im Originalloкус in den unterschiedlichen Stämmen analysiert.

Das erste betrachtete Gen, das ein Prp4-abhängiges Intron besitzt, ist *res1*. Die RT-PCR Analyse zeigt, dass die Stämmen 801, 1105 und 1178 das typische Prp4 Kinase Spleiß-Inhibitions muster zeigen (Abbildung 20). Ohne Inhibitorzugabe liegt hauptsächlich mRNA mit einer Größe von 247 bp vor. Wird 1NM-PP1 Inhibitor dazugegeben, akkumuliert schon nach 10 Min. prä-mRNA (374 bp) und die mRNA Bande verschwindet. Die Akkumulation hält bis 90 Min. nach Inhibition an. Das Verhältnis von mRNA zu prä-mRNA kehrt sich ab 120 Min. erneut um und Spleißen findet wieder statt. Nach 180 Min. wird überwiegend mRNA detektiert, was bedeutet, dass das Spleißen des Introns wieder effizient stattfindet. Sind die Gene beider Kinasen deletiert (Stamm 1176), wird das Spleiß-Inhibitions muster für *res1* nicht mehr beobachtet. Zu allen Zeitpunkten nach Zugabe des Inhibitors wird überwiegend mRNA detektiert und es findet keine Akkumulation von prä-mRNA mehr statt. Somit wird das Intron auch nach Inhibition von Prp4 Kinase gespleißt (Abbildung 20).

Tbp1, das zweite betrachtete Gen, besitzt drei Introns, wobei das dritte Prp4-abhängige Intron betrachtet wird. Die RT-PCR Analyse zeigt auch bei diesem Intron, bei den Stämmen 801, 1105 und 1178 das typische Spleiß-Inhibitionsverhalten. Prä-mRNA akkumuliert nach Inhibitorzugabe für 60 Min. bevor sich das Verhältnis von mRNA zu prä-mRNA nach 90 Min. wieder umdreht und Spleißen wieder stattfindet. Sind aber beide Kinasen deletiert (Stamm 1176) wird das Intron zu allen Zeitpunkten nach Inhibition gespleißt. Es wird überwiegend mRNA detektiert und es wird keine Akkumulation von prä-mRNA beobachtet (Abbildung 20). Das dritte Gen ist *mrp17*. Bei diesem Gen wurden beide Introns mit Hilfe von RT-PCR untersucht. Das erste Prp4-abhängige Intron zeigt bei den Stämmen 801, 1105 und 1178 das bekannte Spleiß-Inhibitions muster. Nach Inhibition akkumuliert prä-mRNA, das Verhältnis zwischen mRNA und prä-mRNA dreht sich nach 120 Min. wieder um und spleißen findet wieder statt. Auch bei diesem Intron zeigt der Stamm 1176 nicht mehr das typische Spleiß-Inhibitionsverhalten. Es findet keine Akkumulation von prä-mRNA nach Inhibition statt und es wird zu allen Zeitpunkten überwiegend mRNA detektiert (Abbildung 20).

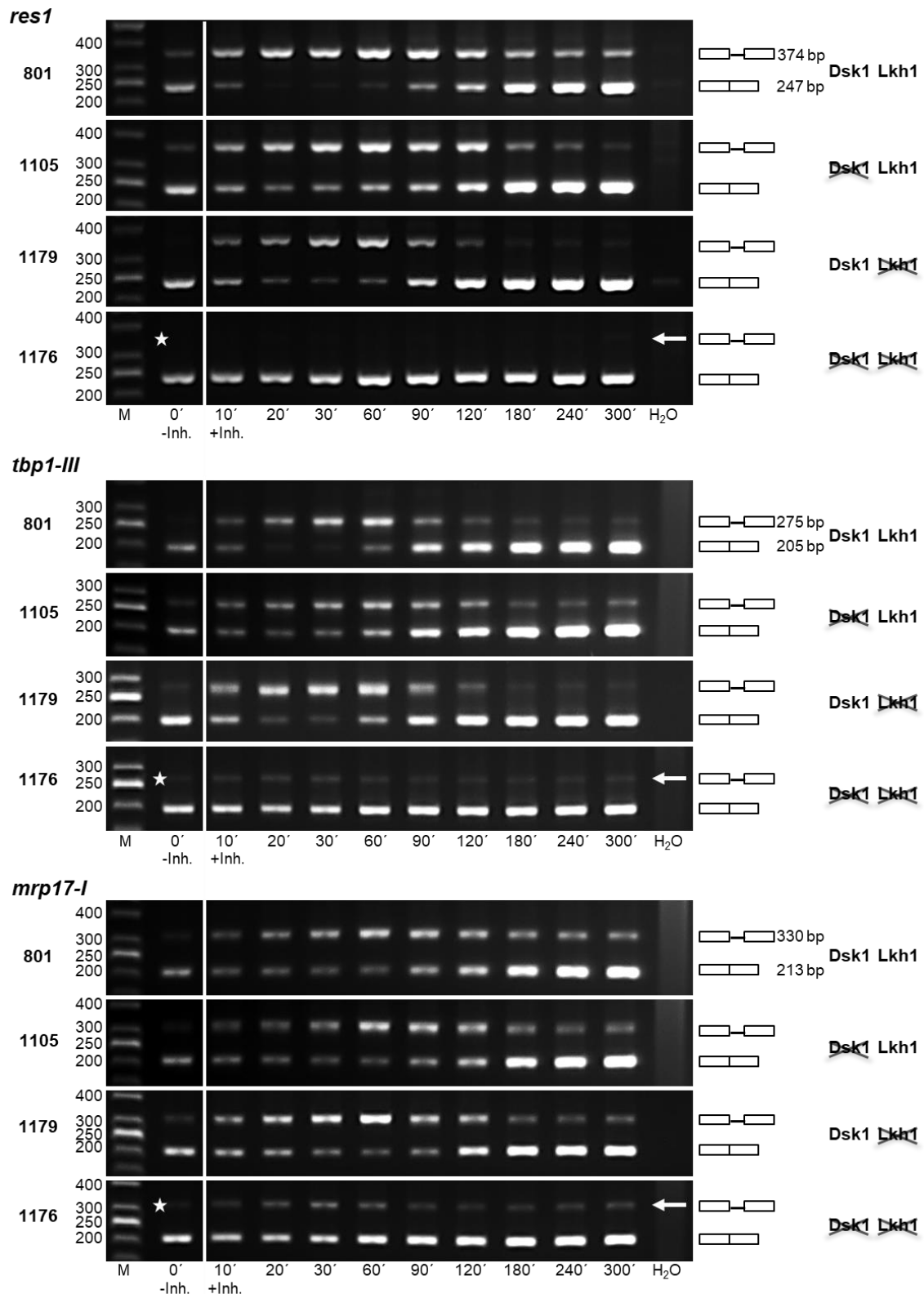


Abbildung 20| Die RT-PCR Analyse zeigt bei den Prp4-abhängigen Introns von *res1*, *tbp1-III* und *mrp17-I*, dass die gleichzeitige Deletion der beiden nicht-essentiellen Kinasen Dsk1 und Lkh1 einen Einfluss auf die Prp4-Abhängigkeit hat

Ohne Zugabe von Inhibitor (0', -Inh.) wird bei allen drei Genen hauptsächlich mRNA amplifiziert. Während bei den Stämmen 801, 1105 und 1178 von 10' bis 90' nach Zugabe von Inhibitor (+Inh., 10 µM 1NM-PP1) bei allen drei Genen überwiegend prä-mRNA detektiert wird, ist bei dem Stamm 1176 die Akkumulation von prä-mRNA nach Inhibitorzugabe bei allen drei Introns beeinflusst und es wird ausschließlich mRNA amplifiziert. *, markiert die Position des zu erwartenden

II Ergebnisse

prä-mRNA Fragments; M, Größenstandard; Pfeil: zeigt, dass die Stärke der Akkumulation von prä-mRNA beeinflusst ist; Rechts: schematische Darstellung von prä-mRNA sowie mRNA mit den zu erwartenden Fragmentgrößen und die An- bzw. Abwesenheit der Kinasen Dsk1 und Lkh1. Links: Stammnummern und Größenangaben des Standards; H₂O, Kontrollreaktion ohne RNA als Template. Bei Genen mit mehreren Introns werden die Introns mit römischen Zahlen nummeriert.

Die beiden untersuchten Prp4-unabhängig gespleißten Introns der Gene *rpl29* und das zweite Intron von *mrp17-II*, werden weder durch die Deletion von *dsk1* noch von *lkh1* beeinflusst. Die RT-PCR Analyse von *rpl29* und *mrp17-II* zeigt, dass bei allen Stämmen und zu allen Zeitpunkten nach Inhibition überwiegend mRNA mit einer Größe von 129 bp bzw. 273 bp vorliegt und keine Akkumulation von prä-mRNA stattfindet. Die Introns werden zu allen Zeitpunkten effizient gespleißt (Abbildung 21).

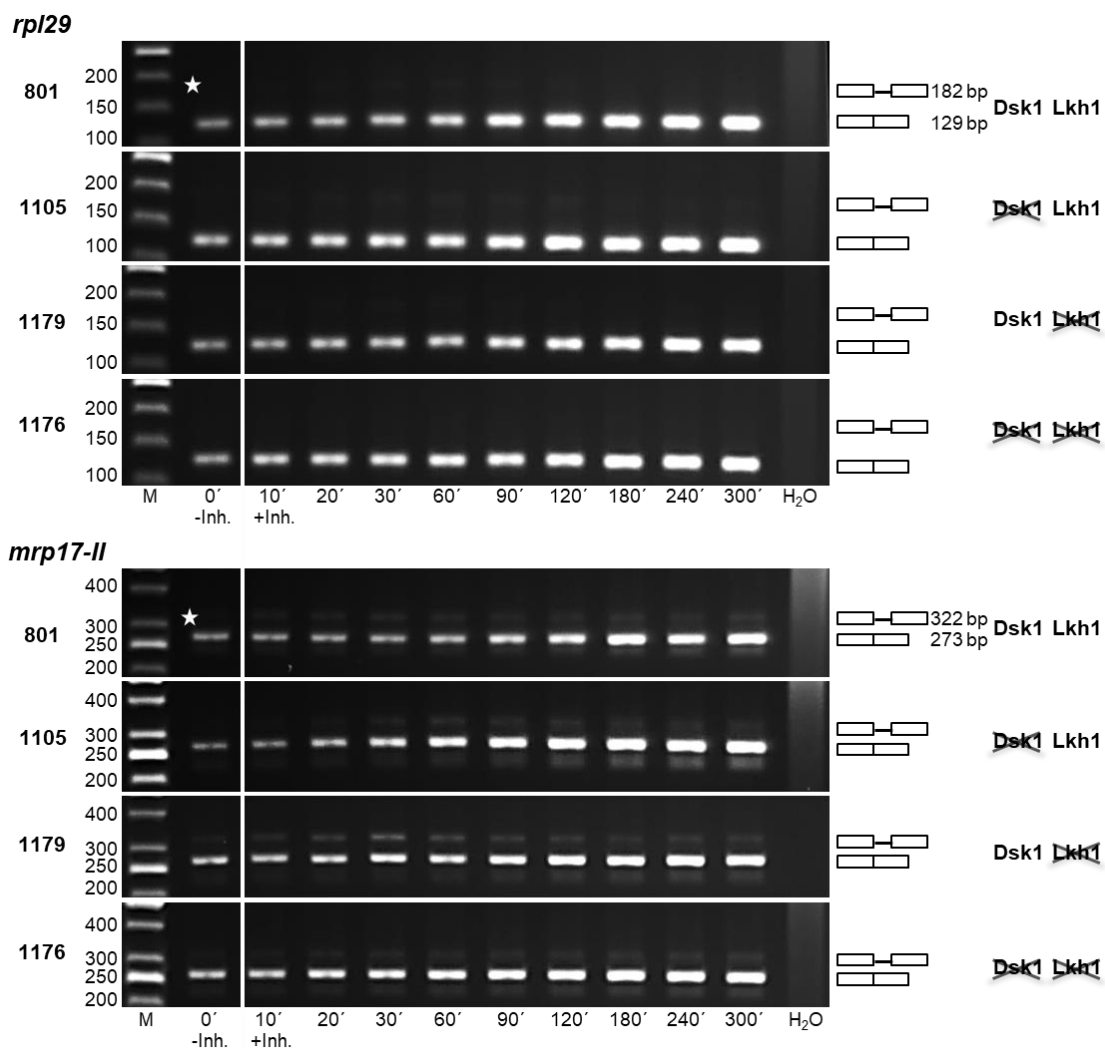


Abbildung 21| Die RT-PCR Analyse zeigt bei den Prp4-unabhängigen Introns von *rpl29* und *mrp17-II*, dass die Deletion von *dsk1* und *lkh1* keinen Einfluss auf die Prp4-Unabhängigkeit hat

Sowohl ohne Zugabe von Inhibitor (0', -Inh.) als auch nach Zugabe von Inhibitor (+Inh., 10 µM 1NM-PP1) wird bei allen Genen hauptsächlich mRNA amplifiziert. Es findet bei keinem der untersuchten Stämme eine Akkumulation von prä-mRNA statt. *, markiert die Position des zu erwartenden prä-mRNA Fragments; M, Größenstandard; Rechts: schematische Darstellung von prä-mRNA sowie mRNA mit den zu erwartenden Fragmentgrößen und die An- bzw. Abwesenheit der SR Proteine. Links: Stammnummern und Größenangaben des Standards; H₂O, Kontrollreaktion ohne RNA als Template. Bei Genen mit mehreren Introns werden die Introns mit römischen Zahlen nummeriert.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass keine der untersuchten Konditionen die Prp4-unabhängigen Introns beeinflusst. Diese werden unter allen Konditionen Prp4-unabhängig gespleißt (Abbildung 21, S. 44). Bei den Prp4-abhängigen Introns beeinflusst die Deletion von *dsk1* oder *lkh1* weder die Akkumulation von prä-mRNA noch das Verschwinden von mRNA. Die Introns zeigen weiterhin das typische Prp4 Kinase Spleiß-Inhibitionsmuster. Nur, wenn beide nicht-essentiellen Kinasen deletiert sind, zeigen alle untersuchten Introns nach Inhibition von Prp4 Kinase kein Spleiß-Inhibitionsmuster mehr. Es wird zu allen Zeitpunkten nach Inhibition der Prp4 Kinase überwiegend mRNA detektiert und es findet keine Akkumulation von prä-mRNA mehr statt (Abbildung 20, S. 43).

4.2 Das SR Protein Srp2 ist auch bei Deletion von *dsk1* und *lkh1* im Kern lokalisiert

In den vorherigen Kapiteln wurden zwei Konditionen identifiziert, die dazu führen, dass Introns, die bisher Prp4 Kinase-abhängig gespleißt wurden, jetzt Prp4 Kinase-unabhängig gespleißt werden. Zum einen ist dies der Fall, wenn beide SR Proteine, Srp1 und Srp2, in der Zelle fehlen (und somit auch nicht mehr im Zellkern vorliegen). Zum anderen, wenn die beide Kinasen, Dsk1 und Lkh1, fehlen. In beiden Fällen ist nach Inhibition von Prp4 Kinase keine Akkumulation von prä-mRNA mehr zu beobachten, es liegt zu allen Zeitpunkten mRNA vor und die Introns werden Prp4-unabhängig gespleißt (Abbildung 15, S. 33 + Abbildung 20, S. 43). Aus der Literatur ist bekannt, dass sowohl Dsk1 als auch Lkh1 Kinase die Interaktion der beiden SR Proteine durch Phosphorylierung *in vitro* beeinflussen (Tang et al., 2002). Außerdem wurde gezeigt, dass in Bezug auf die Lokalisation von Srp2 in der Zelle die RS-Elemente notwendig und zugleich ausreichend sind, damit das Protein im Kern lokalisiert ist. Sind die Serine in den RS-Elementen zu Alaninen mutiert, akkumuliert das Protein im Zytoplasma (Lützelberger et al., 1999). Ob eine Phosphorylierung der Serine für den Kernimport notwendig ist, ist allerdings nicht bekannt. Deswegen sollte überprüft werden, ob die Lokalisation des SR Proteins Srp2 beeinflusst wird, wenn die Kinasen, Dsk1 und Lkh1, in der Zelle fehlen. Dabei könnte die Deletion von *dsk1* und *lkh1* zur Folge haben, dass Srp2 nicht mehr im Kern lokalisiert. Sollte Srp2 nach Deletion von *dsk1* und *lkh1* weiterhin im Kern lokalisiert sein, wäre dies ein Hinweis darauf, dass Srp2, unabhängig von der Lokalisation, nicht mehr an die prä-mRNA binden kann. Die Phosphorylierung durch die Kinasen Dsk1 und Lkh1 würde folglich die Interaktion von Srp2 mit der prä-mRNA beeinflussen. Beide Möglichkeiten wären eine Erklärung dafür, dass die normalerweise Prp4-abhängigen Introns alle Prp4-unabhängig gespleißt werden (Abbildung 20, S. 43). Dies ist vergleichbar mit den Ergebnissen der RT-PCRs, wenn *srp1* deletiert und *srp2* reprimiert ist (und somit nicht mehr im Zellkern vorliegt) (Abbildung 15, S. 33).

Zur Überprüfung, ob Srp2 noch im Kern lokalisiert, wenn *dsk1* und *lkh1* deletiert sind, wurden Stämme verwendet, in denen Srp2 als C-terminal mNeonGreen getaggte Version

(Srp2-mNG) vorliegt. Mit Hilfe homologer Rekombination wurde *srp2* im Genom mit dem Konstrukt *srp2-mNG* ersetzt (Stamm 1277). Das ca. 27 kDa große monomere gelb-grün fluoreszierende Protein, mNeonGreen, stammt aus dem Fluoreszenzprotein des Cephalochordata (Schädellose) *Branchiostoma lanceolatum* (Lanzettfischchen) und wurde 2013 das erste Mal beschrieben (Shaner et al., 2013). Dieses Fluoreszenzprotein wurde zuvor nicht in *S. pombe* sondern nur in Mammalia und *Caenorhabditis elegans* benutzt (Shaner et al., 2013; Heppert et al., 2016; Hostettler et al., 2017; Tanida-Miyake et al., 2018). Deswegen wurde zuerst mNeonGreen als Kontrolle in den *leu1*-Lokus von *S. pombe* unter Kontrolle des Thiamin-reprimierbaren *nmt1* Promotors integriert (Stamm 1325). Dadurch sollte überprüft werden wo das Protein in der Zelle lokalisiert.

1325

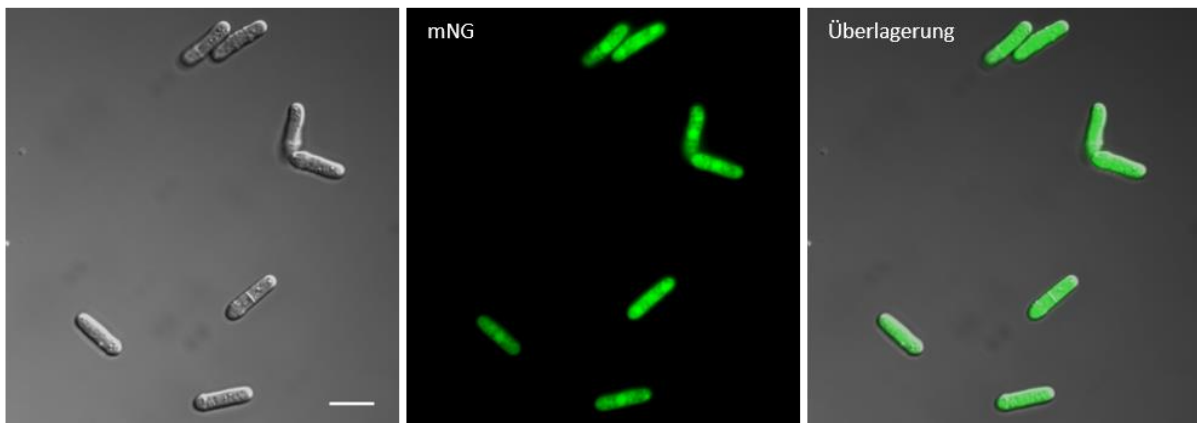


Abbildung 22| mNeonGreen ist sowohl im Zytoplasma als auch im Kern lokalisiert.

Fluoreszenz-mikroskopische Untersuchung der Zellen des Stammes 1325 (*prp4::int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32::int::pML11-mNeonGreen*). Die Zellen wurden 16 Std. nach 200 μ M Thiaminzugabe mikroskopiert, um Überexpression-Artefakte auszuschließen. Der Größenstandard entspricht 10 μ m. mNG, mNeonGreen.

mNeonGreen (mNG) ist in *S. pombe* sowohl im Zytoplasma als auch im Kern zu finden (Abbildung 22) und kann somit für Lokalisierungsuntersuchungen in *S. pombe* verwendet werden.

Der Stamm 1277 besitzt *srp2-mNG* und *prp4-as2*. Die Stämme in denen entweder *dsk1* und/oder *lkh1* deletiert sind, wurden durch Kreuzung hergestellt. Alle Stämme wurden Fluoreszenz-mikroskopisch untersucht, um Srp2-mNG sichtbar zu machen. Außerdem wurden die Zellkerne mit DAPI angefärbt und sichtbar gemacht.

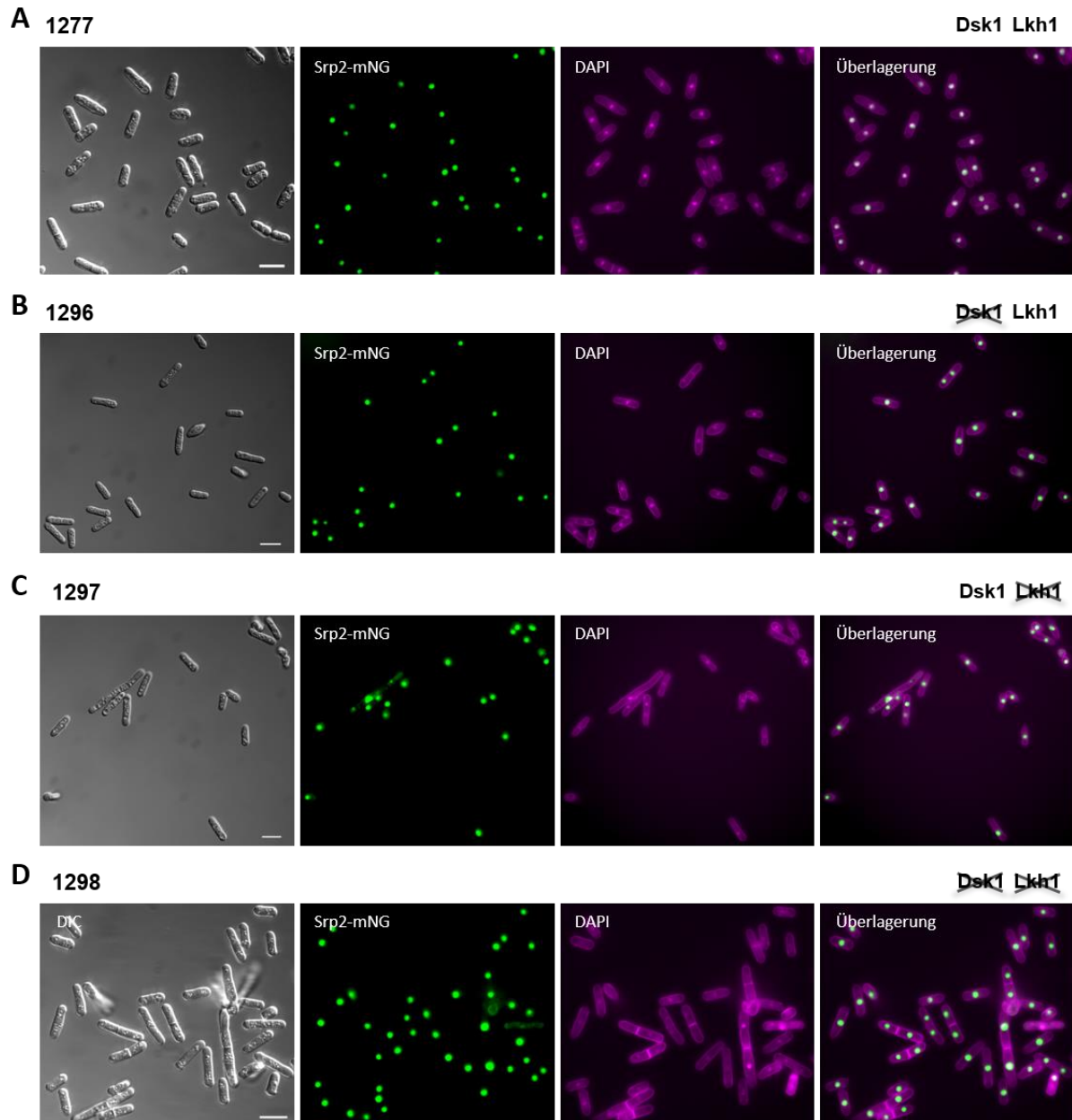


Abbildung 23| Srp2 ist im Kern lokalisiert, wenn Dsk1 Kinase und Lkh1 Kinase deletiert sind

Fluoreszenz-mikroskopische Untersuchung der Zellen unter unterschiedlichen Bedingungen. In allen Stämmen ist Srp2 mit mNeonGreen (mNG) getaggt. Zeitgleich sind die Zellkerne mit DAPI angefärbt. (A) In diesem Stamm (1277) liegt Srp2-mNG im Kern vor. Die beiden Kinasen, Dsk1 und Lkh1, und die analog-sensitive Prp4 Kinase sind in der Zelle vorhanden. (B) Im Stamm (1296), in dem *dsk1* deletiert ist, aber Lkh1 und die analog-sensitive Prp4 Kinase in der Zelle vorhanden ist, lokalisiert Srp2-mNG im Kern. (C) In diesem Stamm (1297) lokalisiert Srp2-mNG ebenfalls im Kern. Dsk1 und die analog-sensitive Prp4 Kinase sind in der Zelle vorhanden, während *lkh1* deletiert ist. (D) Wenn *dsk1* und *lkh1* gleichzeitig deletiert sind und nur noch die analog-sensitive Prp4 Kinase in der Zelle vorhanden ist (Stamm 1298), ist Srp2-mNG im Kern lokalisiert. Der Größenstandard entspricht 10 μ m.

In dem Kontrollstamm 1277, in dem Dsk1, Lkh1 und die Prp4_{as2} in der Zelle vorliegen, lokalisiert Srp2-mNG im Zellkern. Bei Betrachtung des Stammes 1296, in dem *dsk1* deletiert ist, aber Lkh1 und Prp4_{as2} in der Zelle vorliegen, ist Srp2-mNG ebenfalls im Zellkern zu finden. Wenn *lkh1* deletiert ist und Dsk1 und Prp4_{as2} in der Zelle vorliegen (Stamm 1297),

lokalisiert Srp2-mNG im Kern. Sind beide Kinasen, *dsk1* und *lkh1*, in der Zelle deletiert und nur Prp4_{as2} liegt in diesem Stamm noch vor (Stamm 1298), ist Srp2-mNG ebenfalls in fast allen Zellen im Zellkern lokalisiert (Abbildung 23).

Damit wurde gezeigt, dass Srp2-mNG unter allen untersuchten Bedingungen im Zellkern lokalisiert, auch wenn beide Kinasen, *dsk1* und *lkh1*, deletiert sind (Abbildung 23). Dadurch wird ausgeschlossen, dass die Phosphorylierung von Srp2 durch Dsk1 und/oder Lkh1 eine Rolle für den Transport von Srp2 in den Kern spielt. In vorherigen Arbeiten wurde gezeigt, dass die Deletion von *dsk1* und *lkh1* dazu führt, dass Srp2 nicht mehr im Kern lokalisiert (Tang et al., 2007). Allerdings lag in dieser Arbeit das N-terminal getaggte *GFP-srp2* als zusätzliche Kopie auf einem Überexpressions-Plasmid in die Zelle vor. Somit sind die Ergebnisse nicht mit den Ergebnissen dieser Arbeit vergleichbar. Wird *srp2* mit Hilfe homologer Rekombination durch *srp2-mNG* in der Zelle ersetzt, ist Srp2-mNG im Kern lokalisiert, auch wenn *dsk1* und *lkh1* deletiert sind.

5 Mutationen im Exon1 zweier Reportergene beeinflussen die Erkennung und Prp4 Kinase-Abhängigkeit der Introns

In den vorherigen Kapiteln hat sich gezeigt, dass die SR Proteine und ihre Regulation durch Phosphorylierung eine wichtige Rolle während des Spleißprozesses, genauer während der Intronerkennung in *S. pombe*, spielen. Von Mammalia ist bekannt, dass die *trans*-agierenden SR Proteine an spezifische *cis*-regulatorische Sequenzen, den sogenannten ESE-Sequenzen, binden und so die Erkennung der SSs verbessern. SR Proteine rekrutieren nicht nur die Proteine des U1 snRNPs zu der 5'-SS sondern stabilisieren auch deren Bindung an die prä-mRNA durch Interaktion mit diesen (Graveley, 2000; Cho et al., 2011; Zhou und Fu, 2013). ESE-Sequenzen sind häufig kurze, Purin-reiche Sequenzen, die sehr degeneriert sein können (Cartegni et al., 2002). Ob *in vivo* typische ESE-Sequenzen in *S. pombe* existieren, die die Bindung der SR Proteine und somit die Erkennung und Prp4-Abhängigkeit eines Introns beeinflussen, ist bisher unklar. Es wurde bereits gezeigt, dass die Intronerkennung hauptsächlich durch komplementäre Basenpaarung der letzten 3 Nukleotide des 5'-Exons und der sechs Nukleotiden der 5'-SS mit dem 5'-Ende der U1 snRNA stattfindet (Eckert et al., 2016). Dieser 5'-Exon/5'-SS Bereich wird zukünftig mit X₃X₂X₁/5'-SS bezeichnet. In dieser Versuchsreihe soll untersucht werden, ob Mutationen der Sequenz in Exon1 oberhalb der X₃X₂X₁/5'-SS einen Einfluss auf die Erkennung und Prp4 Kinase-Abhängigkeit des Introns haben. Dafür wurden zwei Reportergene konstruiert. Als erstes wurde das *res1*-Gen verwendet, das zuvor schon für die Mutationsanalysen in Bezug auf die Prp4-Abhängigkeit verwendet wurde (Eckert et al., 2016; Andrée-Busch et al., 2018). Dieses Gen besitzt ein Intron, das eine Größe von 127 bp aufweist und Prp4-abhängig gespleißt wird. Als zweites

Reportergen wurde das *trs402*-Gen verwendet, das ebenfalls ein Intron mit einer Größe von 145 bp besitzt. Dieses Intron wird Prp4-unabhängig gespleißt. Ebenso wie bei den vorherigen Untersuchungen (Eckert, 2015), wurde eine zweite Kopie dieser Gene, *res1'* bzw. *trs402'*, in den *leu1*-Lokus integriert.

5.1 Konstruktion des *res1'*-Reportergens

Das Gen *res1* wurde durch gerichtete Mutagenese verändert und anschließend über die Schnittstellen *Bam*HI und *Sal*I in den Vektor pML81HA kloniert. Dieser Vektor ist ein Integrationsvektor der Spaltheife. Nach Linearisierung mit *Bs*WI im *leu1*⁺-Gen des Vektors, kann dieser in den *leu1*-Lokus des Leucin auxotrophen Hefestamms 812 über homologe Rekombination integriert werden. Der Vektor besitzt außerdem den konstitutiven *nmt81* Promotor, gefolgt von einem HA-Tag, und der *nmt1* Terminationssequenz, um die Transkription des integrierten Gens, zwischen HA-Tag und Terminationssequenz zu ermöglichen. Bei der Klonierung des *res1'*-Gens wurde eine Leserasterverschiebung zwischen dem HA-Tag und dem *res1'*-Gen eingefügt. Das führt dazu, dass das *res1'*-Gen zwar transkribiert wird, aber nach der Transkription durch die Leserasterverschiebung kein Res1'-Protein gebildet werden kann. In der Hefezelle liegen dann zwei Kopien des *res1*-Gens vor, das *res1*⁺ im *res1*-Lokus und das *res1'* im *leu1*-Lokus (Abbildung 24).

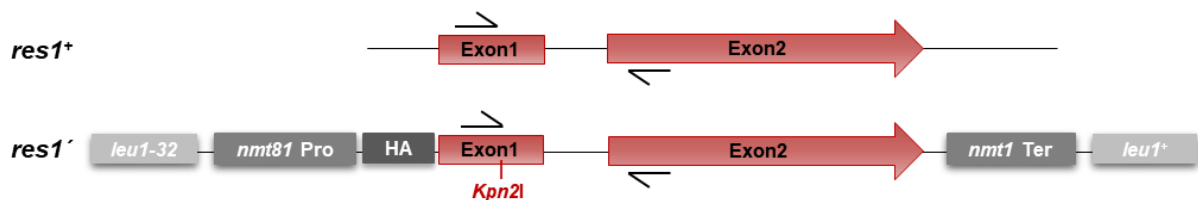


Abbildung 24| Die Allele, *res1*⁺ und *res1'*, liegen beide in der Zelle vor

Schematische Darstellung der beiden Allele *res1*⁺ im *res1*-Lokus und *res1'* im *leu1*-Lokus im Vergleich. Die Pfeile kennzeichnen die Positionen der verwendeten Primer in der RT-PCR. Die *Kpn2I* Schnittstelle wird für die Unterscheidung zwischen den beiden Transkripten während der RT-PCR benötigt.

Zur Untersuchung der Spleißeffizienz wurde zu verschiedenen Zeitpunkten RNA isoliert und anschließend eine semiquantitative RT-PCR durchgeführt. Dafür wurden die Primer so gewählt, dass ausschließlich die Spleißeffizienz des *res1*⁺-Gens oder des *res1'*-Reportergens betrachtet wird. Dies ist möglich, indem der Vorwärts-Primer genau dort bindet und endet, wo sich die *Kpn2I*-Schnittstelle im Reportertranskript befindet.

5.2 Das Intron des Allels *res1*^{-WT.K} zeigt auch im *leu1*-Lokus ein Prp4 Kinase-abhängiges Spleißverhalten

Zuerst sollte überprüft werden, ob *res1*^{-WT.K} im *leu1*-Lokus weiterhin das typische Prp4-abhängige Spleiß-Inhibitionsmuster zeigt und die Primer spezifisch das Reportertranskript amplifizieren. Dazu wurden die Primer, wie zuvor erwähnt, so gewählt, dass bei der RT-PCR ausschließlich eines der beiden Gene betrachtet werden kann. Für prä-mRNA entsteht dabei ein Fragment von 400 bp und für mRNA liegt die Größe bei 273 bp (Abbildung 25).

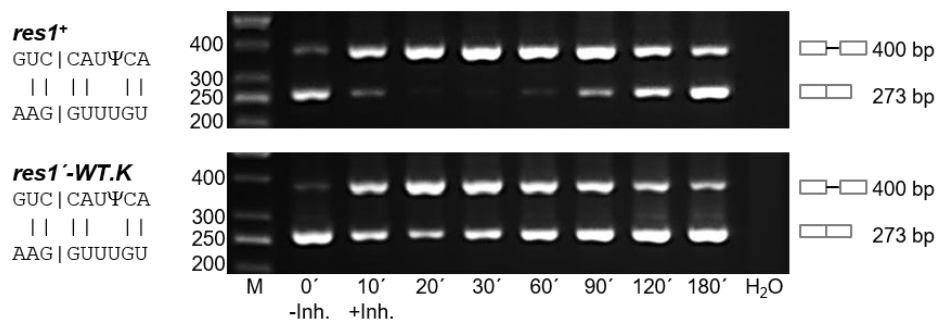


Abbildung 25| Die Transkripte *res1*⁺ und *res1*^{-WT.K} zeigen beide das Prp4-abhängige Spleiß-Inhibitionsmuster

Die beiden Transkripte *res1*⁺ (Stamm 812) und *res1*^{-WT.K} (Stamm 1111) zeigen beide ohne Inhibition der Prp4 Kinase (-Inh.) hauptsächlich mRNA und nach Inhibition (+Inh.) eine Akkumulation von prä-mRNA. Diese Verhältnis von prä-mRNA zu mRNA dreht sich nach ca. 90 Min. wieder um und es wird erneut mRNA detektiert. M, Größenstandard; H₂O, Kontrollreaktion ohne RNA als Template; Rechts: schematische Darstellung von prä-mRNA sowie mRNA mit den zu erwartenden Fragmentgrößen. Links: Größenangaben des Standards und schematische Darstellung der Basenpaarung der U1 snRNA und Exon1/5'-SS; |, Watson-Crick Basenpaarung; Ψ, Pseudouridin.

Beide Transkripte, *res1*⁺ und *res1*^{-WT.K}, können mit der U1 snRNA sechs von neun möglichen komplementäre Basenpaarungen an der X₃X₂X₁/5'-SS eingehen. Vier Basenpaarungen liegen dabei in der 5'-SS an Position +1, +2, +5 und +6 und zwei an Position -1 und -2 im Exon1. Diese Interaktion ist ausreichend, um ohne Inhibition der Prp4 Kinase, sowohl bei *res1*⁺ (Stamm 812) als auch bei *res1*^{-WT.K} (Stamm 1111), das Intron effizient herauszuspleißen (Abbildung 25). Der Stamm 812 besitzt ausschließlich das *res1*⁺ im Originallokus. Bereits 10 Min. nach Inhibition der Prp4 Kinase akkumuliert prä-mRNA und die mRNA verschwindet. Nach ca. 90 Min. Inhibition beginnt das Spleißen erneut und mRNA kann wieder detektiert werden. Der Stamm 1111 hat zusätzlich zu *res1*⁺ ein *res1*^{-WT.K} im *leu1*-Lokus. Die verwendeten Primer detektieren ausschließlich das Transkript von *res1*^{-WT.K} im *leu1*-Lokus. Auch bei diesem Reportertranskript kommt es 10 Min. nach Inhibition der Kinase zu einer Akkumulation von prä-mRNA, die sich nach 90 Min. wieder umkehrt. Allerdings ist hier zu erkennen, dass die mRNA im Vergleich zu *res1*⁺ nie ganz verschwindet (Abbildung 25). Hierbei ist anzumerken, dass sich das zusätzliche *res1*^{-WT.K} im *leu1*-Lokus unter dem *nmt81* Promotor befindet, der zu einer veränderten Menge an

Transkript führt. Damit verhält sich das Prp4-abhängige *res1*^{-WT.K} im *leu1*-Lokus wie das *res1*⁺ im Originallokus und kann als Reportergen wie in den vorherigen Untersuchungen verwendet werden (Eckert et al., 2016).

5.3 Mutationen in Exon1 oberhalb der AAG/5'-SS des Prp4-abhängigen *res1*⁻-Reportergens beeinflussen die Erkennung und Prp4 Kinase-Abhängigkeit des Introns

In diesem Kapitel werden Mutationen in Exon1 oberhalb der AAG/5'-SS des *res1*⁻-Reportergens gesetzt, um zu untersuchen, ob Mutationen in diesem Bereich eine Auswirkung auf die Erkennung und Prp4-Abhängigkeit des Introns haben. In Abbildung 26 ist eine Übersicht der Bereiche (Mut1-5) in Exon1 oberhalb der AAG/5'-SS des Prp4-abhängigen *res1*⁻-Reportergens zu finden, die mutiert wurden. Diese Bereiche umfassen jeweils 10 Nukleotide.

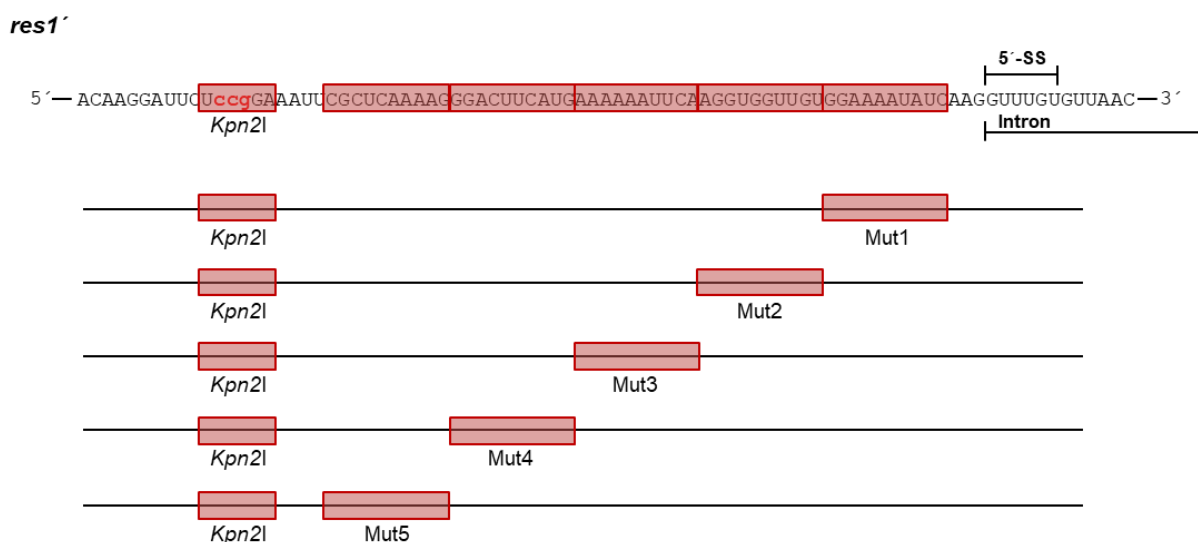


Abbildung 26 Übersicht der Bereiche in Exon1 oberhalb der AAG/5'-SS des Prp4-abhängigen *res1*⁻-Reportergens, in denen Mutationen gesetzt wurden

Durch die gerichtete *in vitro* Mutagenese nach Kunkel wurden die Bereiche Mut1 bis Mut5 (rote Kästen) in As, Cs, Gs oder Us mutiert. Außerdem wurde eine *Kpn2I*-Schnittstelle eingefügt, um die positiven Plasmide identifizieren und in der RT-PCR zwischen den Allelen *res1*⁺ im *res1*-Lokus und *res1*⁻ im *leu1*-Lokus unterscheiden zu können. Zusätzlich wurden in dem Bereich Mut1 noch Mutationen von unterschiedlichen Variationen der unterschiedlichen Nukleotide gesetzt und untersucht. Markiert ist außerdem der Intronanfang mit der 5'-SS. 5'-SS, 5'-Spleißstelle.

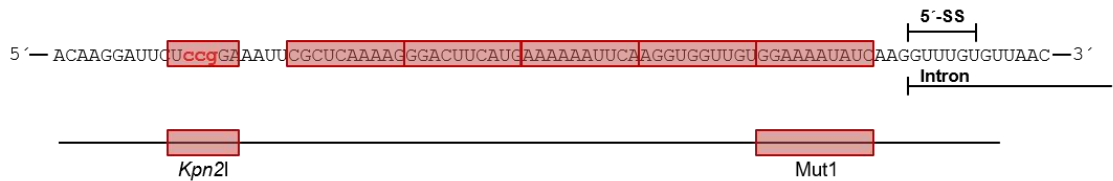
Es wurden jeweils 10 Nukleotide in Cs, Us, As oder Gs mutiert. Diese Bereiche werden mit Mut1 bis Mut5 bezeichnet. Die letzten drei Nukleotide in Exon1 (AAG) wurde dabei nicht verändert, da diese wie zuvor beschrieben eine Interaktion mit der U1 snRNA eingehen. Im Bereich Mut1 wurden zusätzlich Mutationen in verschiedenen Positionen gesetzt, die in den folgenden Kapiteln gezeigt und diskutiert werden.

5.3.1 Mutationen in den letzten 10 Nukleotiden im Exon1 haben Auswirkungen auf die Erkennung und Prp4 Kinase-Abhängigkeit des Introns

Als erstes wurden die 10 Nukleotide direkt oberhalb der AAG/5'-SS von Position -4 bis -13 (Mut1) in Cs, Us, As und Gs mutiert. Zum Vergleich ist die RT-PCR des Allels *res1'-WT.K* mit der Wildtyp-Sequenz in Bereich Mut1 gezeigt. Ohne Inhibition der Kinase wird das Intron effizient herausgespleißt. Nach Inhibition von Prp4 akkumuliert prä-mRNA von 10 bis ca. 90 Min. bis das Spleißen wieder beginnt. Dabei verschwindet die mRNA nicht vollständig (Abbildung 27 A).

A

res1'-WT.K



res1'-WT.K

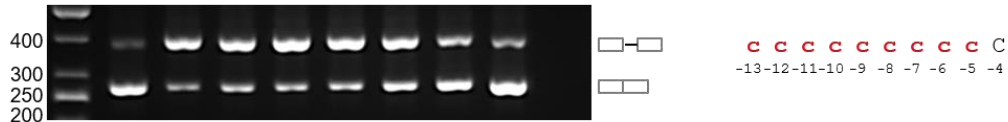
GUC | CAUΨCA
|| || ||
AAG | GUUUGU



B

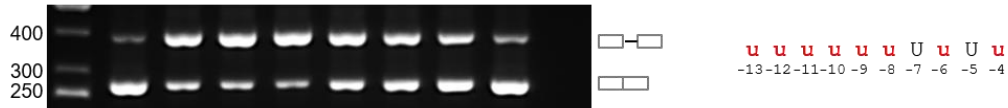
res1'-Mut1C.K

GUC | CAUΨCA
|| || ||
AAG | GUUUGU



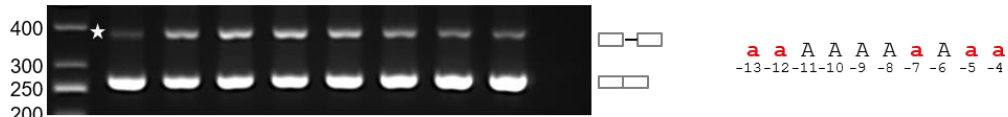
res1'-Mut1U.K

GUC | CAUΨCA
|| || ||
AAG | GUUUGU



res1'-Mut1A.K

GUC | CAUΨCA
|| || ||
AAG | GUUUGU



res1'-Mut1G.K

GUC | CAUΨCA
|| || ||
AAG | GUUUGU



M 0' 10' 20' 30' 60' 90' 120' 180' H₂O
-Inh. +Inh.

Abbildung 27| Mutationen in dem Bereich Mut1 beeinflussen sowohl die Erkennung als auch Prp4-Abhängigkeit des Introns des Prp4-abhängigen *res1'*-Reportergens

(A) Schematische Darstellung des zu mutierenden Bereichs Mut1 und die RT-PCR des Prp4-abhängigen Wildtyp-Allels *res1'-WT.K*. (B) Gezeigt ist die RT-PCR der gesetzten Mutationen in Bereich Mut1. Dabei wurden alle Nukleotide in diesem Bereich in Cs, Us, As oder Gs mutiert. Die RT-PCR zeigt, dass die Mutationen in diesem Bereich unterschiedliche Einflüsse haben. Entweder wird die Prp4 Kinase-Abhängigkeit nicht beeinflusst und das Intron weiterhin nach Inhibition der Kinase (+Inh.) Prp4-abhängig gespleißt (*res1'-Mut1C.K* + *res1'-Mut1U.K*), das Intron wird nach Inhibition der Kinase (+Inh.) Prp4-unabhängig gespleißt (*res1'-Mut1A.K*) oder das Intron wird gar nicht mehr, auch ohne Inhibition, der Kinase erkannt (*res1'-Mut1G.K*). M, Größenstandard; H₂O, Kontrollreaktion ohne RNA als Template; Rechts: schematische Darstellung von prä-mRNA sowie mRNA und die gesetzten Mutationen. Mutierte Basen sind dick gedruckt, rot und mit kleinen Buchstaben hervorgehoben. Die Positionen sind angegeben. Links: Größenangaben des Standards und schematische Darstellung der

Basenpaarung der U1 snRNA und Exon1/5'-SS; Ψ, Pseudouridin; |, Watson-Crick Basenpaarung; *, markiert die Position des zu erwartenden prä-mRNA bzw. mRNA Fragments.

Bei dem Allel *res1'-Mut1C.K* wurden die Basen von Position -5 bis -13 in Cs mutiert. Die RT-PCR zeigt das typische Prp4-abhängige Spleiß-Inhibitionsmuster. Ohne Inhibition der Kinase wird das Intron effizient herausgespleißt. Nach 10 Min. nach Inhibition der Prp4 Kinase kommt es zu einer Akkumulation von prä-mRNA, die sich nach 90 Min. wieder umkehrt. Das Allel *res1'-Mut1U.K*, bei dem die Basen an den Positionen -4, -6 und -8 bis -13 in Us mutiert sind, zeigt das gleiche Ergebnis. Auch dieses Intron wird Prp4-abhängig gespleißt. Werden allerdings die Positionen -4, -5, -7, -12 und -13 in As mutiert wird das Intron Prp4-unabhängig gespleißt. Diese Mutationen, die zu 10 Adenosin-Nukleotiden im Allel *res1'-Mut1A.K* führen, haben zur Folge, dass sowohl ohne Inhibitor als mit Inhibitor der Kinase das Intron gespleißt wird und zu allen Zeitpunkten mehr mRNA als prä-mRNA vorliegt. Es ist allerdings eine leichte Verschlechterung der Spleißeffizienz nach Inhibition der Kinase zu beobachten. Das heißt, dass nach Inhibition der Kinase eine kleine Anzahl von Transkripten nicht mehr gespleißt wird und deshalb die prä-mRNA Bande zu sehen ist. Bei dem Allel *res1'-Mut1G.K* wurden die Positionen -4 bis -11 in Gs mutiert. Die RT-PCR zeigt, dass schon ohne Inhibition der Kinase ausschließlich prä-mRNA detektiert wird. Dies bedeutet, dass das Intron nicht mehr erkannt und gespleißt wird (Abbildung 27 B). Somit haben Mutationen des Bereichs Mut1 in Cs und Us keine Konsequenzen und das Intron wird weiterhin Prp4-abhängig gespleißt. Wird dieser Bereich allerdings in As mutiert, führt dies zu einem Prp4-unabhängig gespleißten Intron. Ist der Bereich in Gs mutiert, wird das Intron nicht mehr erkannt.

5.3.2 Mutationen in den letzten 20 Nukleotiden im Exon1 haben einen Einfluss auf die Prp4 Kinase-Abhängigkeit des Introns

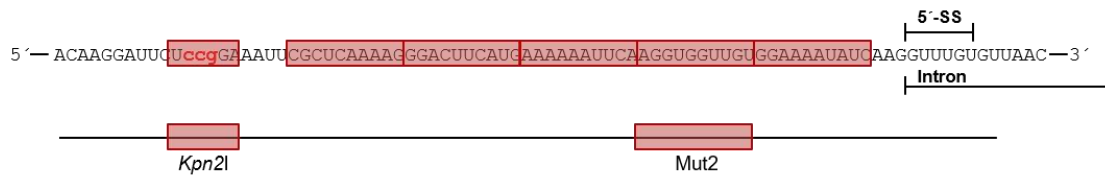
Als nächstes wurden die 10 Nukleotide von Position -14 bis -23 (Mut2) in Cs, Us, As und Gs mutiert. Zum Vergleich ist wieder die RT-PCR des Allels *res1'-WT.K* mit der Wildtyp-Sequenz in Bereich Mut2 gezeigt. Das Intron wird, wie zuvor beschrieben, Prp4-abhängig gespleißt (Abbildung 28 A). Bei dem Allel *res1'-Mut2C.K* wurden die Basen von Position -14 bis -23 in Cs mutiert. Die RT-PCR zeigt das typische Prp4-abhängige Spleiß-Inhibitionsmuster. Zum Zeitpunkt 0 ohne Inhibition der Kinase wird das Intron effizient herausgespleißt. Von 10 bis ca. 90 Min. nach Inhibition von Prp4 Kinase (+Inh.) akkumuliert prä-mRNA. Das Spleißen beginnt erneut nach 90 Min. nach Inhibition der Kinase. Die mRNA verschwindet wiederum zu allen Zeitpunkten nicht vollständig. Das gleiche Spleiß-Inhibitionsmuster ist auch bei der RT-PCR des Allels *res1'-Mut2G.K* zu finden. Bei diesem Allel sind die Basen an den Positionen -14, -16, -17, -20 und -23 in Gs mutiert. Die beiden Allele *res1'-Mut2U.K* und *res1'-Mut2A.K* verhalten sich anders. Bei dem Allel *res1'-Mut2U.K* sind die Basen an den Positionen -15, -18, -19 und -21 bis -23 in Us und bei

II Ergebnisse

dem Allel *res1*⁻*Mut2A.K* sind die Basen an den Positionen -14 bis -22 in As mutiert. Die RT-PCRs zeigen, dass diese beiden Allele Prp4-unabhängig gespleißt werden, das heißt zu allen Zeitpunkten liegt mehr mRNA als prä-mRNA vor. Es ist allerdings eine Verschlechterung der Spleißeffizienz nach Inhibition der Kinase zu finden. Das heißt nach Inhibition der Kinase wird eine kleine Anzahl von Transkripten nicht mehr gespleißt und die prä-mRNA Bande ist deshalb zu sehen (Abbildung 28 B).

A

res1⁻*WT.K*

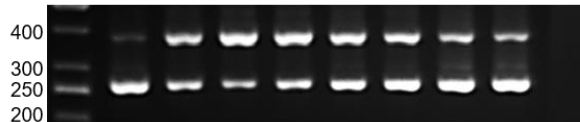


res1⁻*WT.K*

GUC | CAUΨCA

|| || ||

AAG | GUUUGU



400 bp

273 bp

A G U G G U U G U

-23 -22 -21 -20 -19 -18 -17 -16 -15 -14

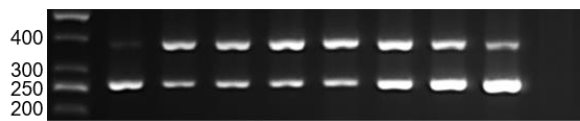
B

res1⁻*Mut2C.K*

GUC | CAUΨCA

|| || ||

AAG | GUUUGU



400 bp

273 bp

C C C C C C C C C

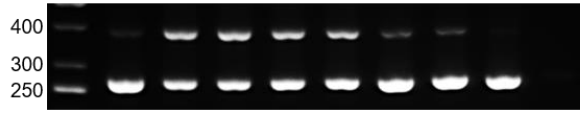
-23 -22 -21 -20 -19 -18 -17 -16 -15 -14

res1⁻*Mut2U.K*

GUC | CAUΨCA

|| || ||

AAG | GUUUGU



400 bp

273 bp

U U U U U U U U U

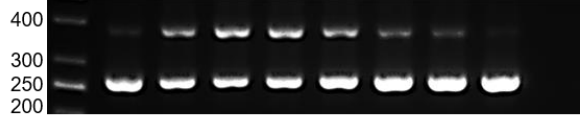
-23 -22 -21 -20 -19 -18 -17 -16 -15 -14

res1⁻*Mut2A.K*

GUC | CAUΨCA

|| || ||

AAG | GUUUGU



400 bp

273 bp

A a a a a a a a a

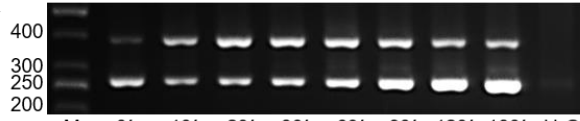
-23 -22 -21 -20 -19 -18 -17 -16 -15 -14

res1⁻*Mut2G.K*

GUC | CAUΨCA

|| || ||

AAG | GUUUGU



400 bp

273 bp

g G G g G G g G G

-23 -22 -21 -20 -19 -18 -17 -16 -15 -14

M 0' 10' 20' 30' 60' 90' 120' 180' H₂O
-Inh. +Inh.

Abbildung 28| Mutationen in dem Bereich Mut2 verändern die Prp4-Abhängigkeit des Introns des Prp4-abhängigen *res1*⁻Reportergens

(A) Schematische Darstellung des zu mutierenden Bereichs Mut2 und die RT-PCR des Prp4-abhängigen Wildtyp-Allels *res1*⁻*WT.K*. (B) Gezeigt ist die RT-PCR der gesetzten Mutationen in Bereich Mut2. Dabei wurden alle Nukleotide in diesem Bereich in Cs, Us, As oder Gs mutiert. Die RT-PCR zeigt, dass die Mutationen in diesem Bereich entweder die Prp4 Kinase-Abhängigkeit nicht beeinflussen und das Intron wird weiterhin nach Inhibition der Kinase (+Inh.) Prp4-abhängig gespleißt (*res1*⁻*Mut2C.K* + *res1*⁻*Mut2G.K*) oder das Intron wird nach Inhibition der Kinase (+Inh.) Prp4-unabhängig gespleißt (*res1*⁻*Mut2U.K* + *res1*⁻*Mut2A.K*). M, Größenstandard; H₂O, Kontrollreaktion ohne RNA als Template; Rechts: schematische Darstellung von prä-mRNA sowie mRNA und die gesetzten Mutationen. Mutierte Basen sind dick gedruckt, rot und mit kleinen Buchstaben hervorgehoben. Die Positionen sind angegeben. Links: Größenangaben des Standards und schematische Darstellung der Basenpaarung der U1 snRNA und Exon1/5'-SS; Ψ, Pseudouridin; |, Watson-Crick Basenpaarung.

Zusammenfassend haben Mutationen des Bereichs Mut2 in Cs und Gs keinen Einfluss auf die Prp4-Abhängigkeit des Introns. Wird dieser Bereich allerdings in Us oder As mutiert, führt dies zu einem Prp4-unabhängig gespleißten Intron, wobei die Spleißeffizienz nach Inhibition der Prp4 Kinase geringer ist.

5.3.3 Mutationen in den Bereichen Mut3, Mut4 und Mut5 verändern die Prp4 Kinase-Abhängigkeit des Introns nicht

Werden die Mutationen in den Bereichen Mut3, Mut4 und Mut5 betrachtet, ist kaum eine Auswirkung in Bezug auf die Prp4 Kinase-Abhängigkeit des Introns zu sehen. In dem Bereich Mut3 wurden die Nukleotide von Position -24 bis -33, in dem Bereich Mut4 von Position -34 bis -43 und in dem Bereich Mut5 von Position -44 bis -53 jeweils in Cs, Us, As und Gs mutiert. Alle Allele zeigen ein Prp4-abhängiges Spleiß-Inhibitionsverhalten. Zum Zeitpunkt 0 ohne Inhibition der Kinase wird das Intron effizient gespleißt. Nach Inhibition von Prp4 Kinase findet eine Akkumulation von prä-mRNA von 10 Min. bis ca. 90 Min statt. Dann beginnt das Spleißen erneut und es wird mRNA detektiert. Dabei verschwindet die mRNA wiederum, wie bei dem *res1'-WT.K* Allel, nicht vollständig (Anhang: Abbildung 55, S. 153 + Abbildung 56, S. 154 + Abbildung 57, S. 155). Es sind nur leichte Unterschiede in Hinblick auf die Stärke der Akkumulation von prä-mRNA festzustellen. Manche Allele akkumulieren die prä-mRNA nicht so stark wie *res1'-WT.K* (*res1'-Mut3C.K*, *res1'-Mut3A.K*, *res1'-Mut3G.K*, *res1'-Mut4C.K*, *res1'-Mut5G.K*). Somit beeinflussen Mutationen in den Bereichen Mut3, Mut4 und Mut5 lediglich die Stärke der Akkumulation der prä-mRNA nach Inhibition der Kinase aber alle Allele werden weiterhin Prp4-abhängig gespleißt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Mutationen im Exon1 oberhalb der AAG/5'-SS des Prp4-abhängigen *res1'*-Reportergens sowohl Auswirkungen auf die Prp4 Kinase-Abhängigkeit als auch auf die Erkennung des Introns haben können. Den stärksten Einfluss zeigen Mutationen in dem Bereich Mut1. Zehn Adenosin-Nukleotide führen dazu, dass das Intron Prp4 Kinase-unabhängig gespleißt wird. Bei zehn Guanodin-Nukleotiden wird das Intron nicht mehr erkannt. Liegen zehn Cytidin- oder Uridin-Nukleotide vor, wird das Intron weiterhin Prp4 Kinase-abhängig gespleißt. Im Bereich Mut2 verändern Mutationen in Guanodin- oder Cytidin-Nukleotide die Prp4-Abhängigkeit nicht, während Adenosin- und Uridin-Nukleotide dazu führen, dass das Intron Prp4-unabhängig gespleißt wird. Mutationen in den Bereichen Mut3, Mut4 und Mut5 beeinflussen lediglich die Stärke der Akkumulation der prä-mRNA nach Inhibition der Kinase, aber alle Allele werden weiterhin Prp4-abhängig gespleißt.

5.4 Mutationen in Exon1 oberhalb der AAG/5'-SS des Prp4 Kinase-unabhängigen *res1'-1*-Reportergens haben keine Auswirkung auf das Spleißverhalten des Introns

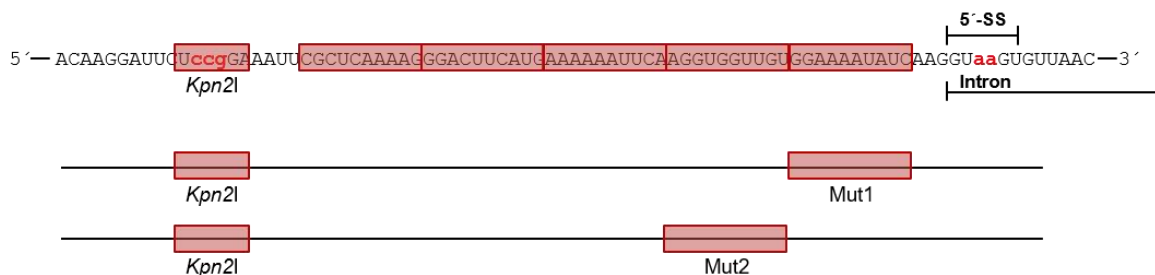
Nachdem gezeigt werden konnte, dass Mutationen in Exon1 oberhalb der AAG/5'-SS des Prp4-abhängigen *res1'*-Reportergens einen Einfluss auf die Prp4-Abhängigkeit und Erkennung des Introns haben, sollte nun überprüft werden, ob Prp4-unabhängige Introns auch davon betroffen sind. Deswegen wurde die Komplementarität der AAG/5'-SS des *res1'*-Reportergens zur U1 snRNA erhöht, sodass eine starke AAG/5'-SS vorliegt. Mit diesem Prp4-unabhängig gespleißten *res1'-1*-Reportergen wurden anschließend Mutationsanalysen in den Bereichen Mut1 und Mut2 durchgeführt.

5.4.1 Zwei zusätzliche Basenpaarungen an Position +3 und +4 in der 5'-SS verwandeln das Intron von *res1'-WT.K* in ein Prp4-unabhängiges Intron

Es wurden zwei zusätzliche Basenpaarungen an Position +3 und +4 in der 5'-SS des Reportergens *res1'-WT.K* eingefügt, da zuvor gezeigt wurde, dass das Intron durch Erhöhung der Komplementarität zur U1 snRNA Prp4-unabhängig gespleißt wird (Eckert et al., 2016).

A

res1'-1.K



B

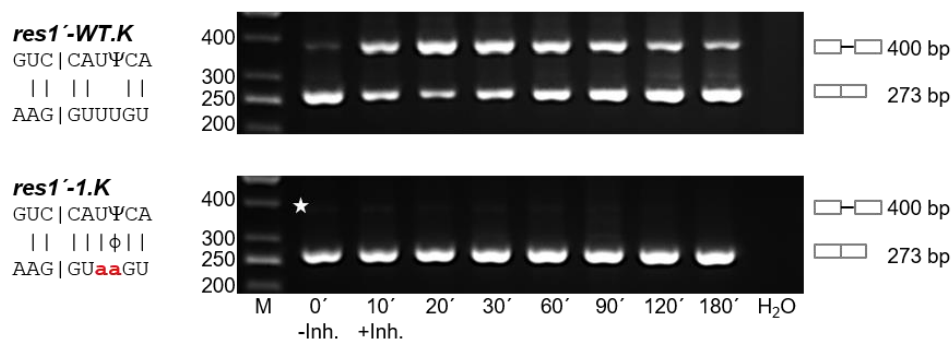


Abbildung 29| Das Reportergen *res1'-1.K* wird Prp4-unabhängig gespleißt

(A) Durch die gerichtete *in vitro* Mutagenese nach Kunkel wurden die Bereiche Mut1 und Mut2 (rote Kästen) in As, Cs, Gs oder Us mutiert. Außerdem wurde eine *Kpn2I*-Schnittstelle eingefügt, um die positiven Plasmide identifizieren und in der RT-PCR zwischen den Allelen *res1*⁺ im *res1*-Lokus und *res1'-1* im *leu1*-Lokus unterscheiden zu können. Markiert ist außerdem der Intronanfang mit der 5'-SS. 5'-SS, 5'-Spleißstelle. (B) Die RT-PCR zeigt, dass die Mutationen an Position +3 und +4 zu einem Prp4-unabhängig gespleißten Intron führen. M, Größenstandard; H₂O, Kontrollreaktion ohne RNA als

Template; Rechts: schematische Darstellung von prä-mRNA sowie mRNA. Mutierte Basen sind dick gedruckt, rot und mit kleinen Buchstaben hervorgehoben. Links: Größenangaben des Standards und schematische Darstellung der Basenpaarung der U1 snRNA und Exon1/5'-SS; Ψ, Pseudouridin; |, Watson-Crick Basenpaarung; ϕ, A-Ψ Paarung; *, markiert die Position des zu erwartenden prä-mRNA Fragments.

Das Prp4-unabhängige Reportergen *res1'-1.K* wurde anschließend für die weiteren Mutationsanalysen verwendet. Dabei erfolgte die Mutagenese und Integration in *S. pombe* analog zu dem Reportergen *res1'-WT.K*. Der einzige Unterschied zwischen den beiden Reportergenen ist die Sequenz der 5'-SS (Abbildung 26, S. 51 + Abbildung 29). Das Allel *res1'-1.K* wird Prp4-unabhängig gespleißt. Die RT-PCR zeigt, dass zu allen untersuchten Zeitpunkten ausschließlich mRNA vorliegt (Abbildung 29 B).

5.4.2 Mutationen in Exon1 des Prp4-unabhängigen Reportergens *res1'-1* beeinflussen die Erkennung und Prp4 Kinase-Unabhängigkeit des Introns nicht

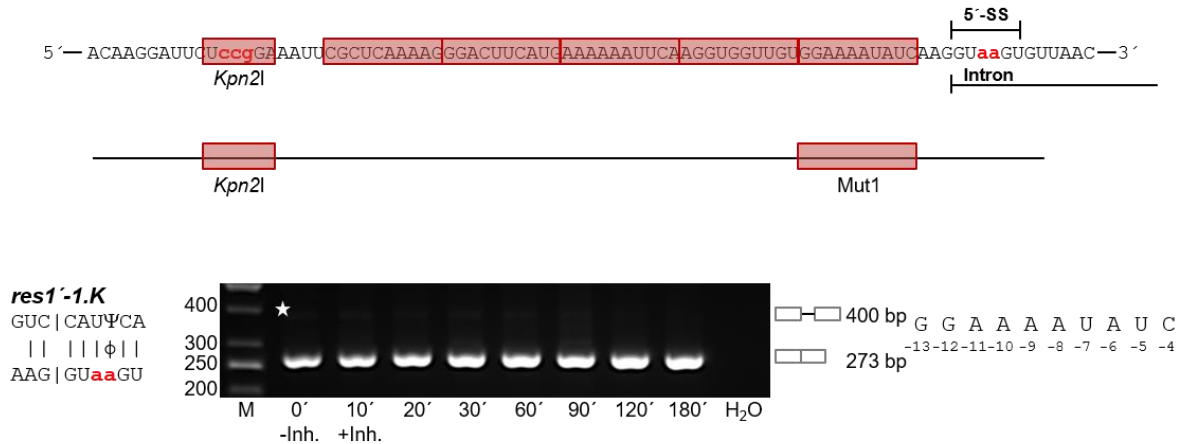
Als erstes wurden die 10 Nukleotide direkt oberhalb der AAG/5'-SS von Position -4 bis -13 (Mut1) in Cs, Us, As und Gs mutiert. Als Vergleich ist die RT-PCR von dem Allel *res1'-1.K* mit der entsprechenden Wildtyp-Sequenz in Bereich Mut1 gezeigt. Die RT-PCR zeigt, dass das Intron zu allen Zeitpunkten effizient herausgespleißt wird (Abbildung 30 A).

Alle betrachteten Allele zeigen ein ähnliches Spleißverhalten. Bei dem Allel *res1'-1Mut1C.K* wurden die Basen an den Positionen -5 bis -13 in Cs, bei dem Allel *res1'-1Mut1U.K*, wurden die Basen an Position -4, -6 und -8 bis -13 in Us, bei dem Allel *res1'-1Mut1A.K* wurden die Basen an den Positionen -4, -5, -7, -12 und -13 in As und bei dem Allel *res1'-1Mut1G.K* wurden die Positionen -4 bis -11 in Gs mutiert. Die RT-PCRs zeigen, dass alle Allele Prp4-unabhängig gespleißt werden. Somit wird das Intron zu allen Zeitpunkten effizient herausgespleißt und es liegt mehr mRNA als prä-mRNA vor. Allerdings zeigt das Allel *res1'-1Mut1G.K* eine Beeinträchtigung in der Spleißeffizienz. Das Intron wird bei diesem Allel schon zum Zeitpunkt 0 nicht so effizient gespleißt wie die Introns der anderen Allele. Das heißt es wird eine kleine Anzahl von Transkripten nicht mehr gespleißt und deshalb ist die prä-mRNA Bande etwas stärker zu sehen. Allerdings verschlechtert sich die Spleißeffizienz nach Inhibition der Kinase nicht, sodass zu allen Zeitpunkten weiterhin mehr mRNA als prä-mRNA vorliegt und das Intron somit Prp4-unabhängig gespleißt wird (Abbildung 30 B).

II Ergebnisse

A

res1^{-1.K}



B

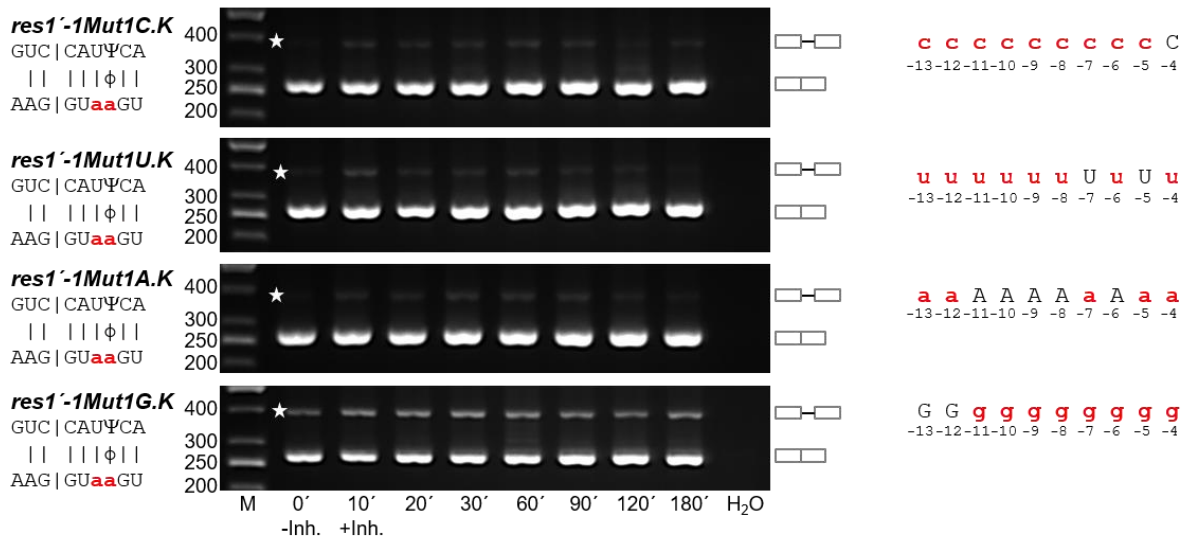


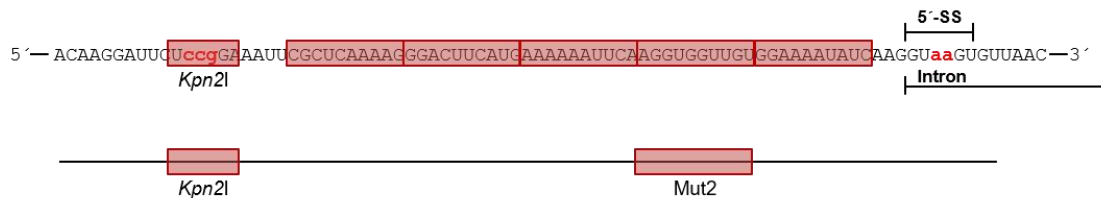
Abbildung 30| Mutationen in dem Bereich Mut1 haben keine Auswirkungen auf die Prp4-Unabhängigkeit des Introns des Prp4-unabhängigen *res1^{-1.K}*-Reportergens

(A) Schematische Darstellung des zu mutierenden Bereichs Mut1 und die RT-PCR des Prp4-unabhängigen Allels *res1^{-1.K}*. (B) Gezeigt ist die RT-PCR der gesetzten Mutationen in Bereich Mut1. Dabei wurden alle Nukleotide in diesem Bereich in Cs, Us, As oder Gs mutiert. Die RT-PCR zeigt, dass die Mutationen in diesem Bereich keinen Einfluss auf das Prp4-unabhängige *res1^{-1.K}*-Reportergen haben. Alle Allele werden weiterhin Prp4-unabhängig, auch nach Inhibition der Kinase (+Inh.), gespleißt (*res1^{-1Mut1C.K}* + *res1^{-1Mut1U.K}* + *res1^{-1Mut1A.K}* + *res1^{-1Mut1G.K}*). M, Größenstandard; H₂O, Kontrollreaktion ohne RNA als Template; Rechts: schematische Darstellung von prä-mRNA sowie mRNA und die gesetzten Mutationen. Mutierte Basen sind dick gedruckt, rot und mit kleinen Buchstaben hervorgehoben. Die Positionen sind angegeben. Links: Größenangaben des Standards und schematische Darstellung der Basenpaarung der U1 snRNA und Exon1/5'-SS; Ψ, Pseudouridin; |, Watson-Crick Basenpaarung; φ, A-Ψ Paarung; *, markiert die Position des zu erwartenden prä-mRNA Fragments.

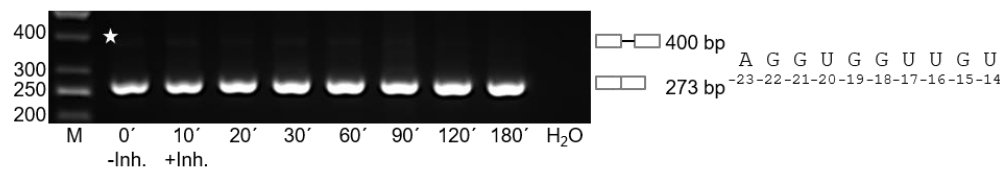
Auch die Mutationen in den nächsten 10 Nukleotiden von Position -14 bis -23 (Abbildung 31 A) zeigen keine Auswirkungen auf das Prp4-unabhängig gespleißte *res1^{-1.K}* Intron. Alle getesteten Allele werden weiterhin Prp4-unabhängig gespleißt. Bei den Allelen wurden folgende Basen mutiert: Bei *res1^{-1Mut2C.K}* wurden die Positionen von -14 bis -23 in Cs, bei *res1^{-1Mut2U.K}* die Positionen -15, -18, -19 und -21 bis -23 in Us, bei *res1^{-1Mut2A.K}* die Positionen -14 bis -22 in As und bei *res1^{-1Mut2G.K}* die Positionen -14, -16, -17, -20 und -23

in Gs mutiert. Die RT-PCR zeigt, dass zu allen Zeitpunkten mehr mRNA als prä-mRNA vorliegt und auch die Spleißeffizienz nicht beeinträchtigt ist (Abbildung 31 B).

A

res1'-1.K*res1'-1.K*

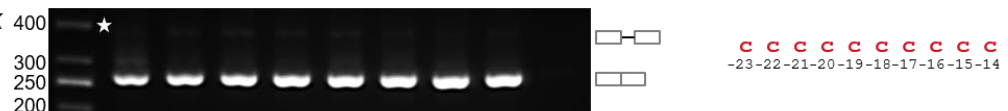
GUC | CAUΨCA
|| |||φ||
AAG | GUaaGU



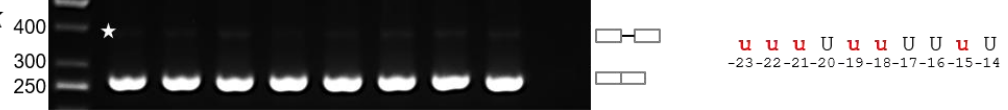
B

res1'-1Mut2C.K

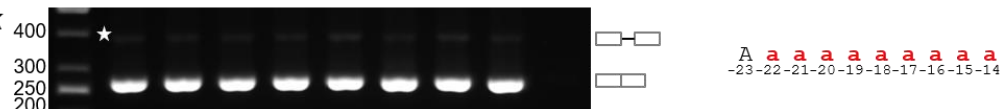
GUC | CAUΨCA
|| |||φ||
AAG | GUaaGU

*res1'-1Mut2U.K*

GUC | CAUΨCA
|| |||φ||
AAG | GUaaGU

*res1'-1Mut2A.K*

GUC | CAUΨCA
|| |||φ||
AAG | GUaaGU

*res1'-1Mut2G.K*

GUC | CAUΨCA
|| |||φ||
AAG | GUaaGU

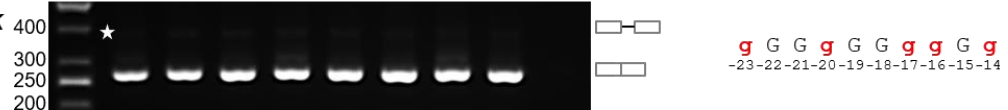


Abbildung 31| Mutationen in dem Bereich Mut2 beeinflussen die Prp4-Unabhängigkeit des Prp4-unabhängigen *res1'-1.K*-Reportergens nicht

(A) Schematische Darstellung des zu mutierenden Bereichs Mut2 und die RT-PCR des Prp4-unabhängigen Allels *res1'-1.K*. (B) Gezeigt ist die RT-PCR der gesetzten Mutationen in Bereich Mut2. Dabei wurden alle Nukleotide in diesem Bereich in Cs, Us, As oder Gs mutiert. Die RT-PCR zeigt, dass die Mutationen in diesem Bereich keinen Einfluss auf das Prp4-unabhängige *res1'-1* Reportergen haben. Alle Allele werden weiterhin Prp4-unabhängig, auch nach Inhibition der Kinase (+Inh.), gespleißt (*res1'-1Mut1C.K* + *res1'-1Mut1U.K* + *res1'-1Mut1A.K* + *res1'-1Mut1G.K*). M, Größenstandard; H₂O, Kontrollreaktion ohne RNA als Template; Rechts: schematische Darstellung von prä-mRNA sowie mRNA und die gesetzten Mutationen. Mutierte Basen sind dick gedruckt, rot und mit kleinen Buchstaben hervorgehoben. Die Positionen sind angegeben. Links: Größenangaben des Standards und schematische Darstellung der Basenpaarung der U1 snRNA und Exon1/5'-SS; Ψ, Pseudouridin; |, Watson-Crick Basenpaarung; φ, A-Ψ Paarung; *, markiert die Position des zu erwartenden prä-mRNA Fragments.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das Prp4-unabhängig gespleißte *res1'-1.K* Allel nicht durch Mutationen in Exon1 oberhalb der AAG/5'-SS beeinflusst wird. Somit scheint es hauptsächlich von der Stärke der Komplementarität zwischen der X₃X₂X₁/5'-SS

und der U1 snRNA abzuhängen, ob ein Intron erkannt und Prp4-abhängig gespleißt wird. Liegt eine starke $X_3X_2X_{-1}/5'$ -SS vor, und das Intron wird Prp4-unabhängig gespleißt, haben Mutationen im Exon1 oberhalb dieser weder einen Einfluss auf die Erkennung noch auf die Prp4-Unabhängigkeit des Introns. Liegt allerdings eine schwache $X_3X_2X_{-1}/5'$ -SS vor und das Intron wird Prp4-abhängig gespleißt, können Mutationen im Exon1 oberhalb dieser sowohl die Erkennung als auch die Prp4-Abhängigkeit des Introns verändern. Diese können dazu führen, dass das Intron Prp4-unabhängig gespleißt wird (Mutationen in As) oder dass das Intron nicht mehr erkannt wird (Mutationen in Gs).

5.5 Bestimmte Nukleotid-Kombinationen in Bereich Mut1 oberhalb der AAG/5'-SS des Prp4-abhängigen *res1'*-Reportergens verändern die Prp4 Kinase-Abhängigkeit

Nachdem gezeigt wurde, dass das Prp4-abhängige Allel *res1'*-WT.K von Mutationen im Bereich Mut1 oberhalb der AAG/5'-SS in 10 gleiche Nukleotide stark beeinflusst wird, sollte nun überprüft werden, ob Kombinationen von Nukleotiden in diesem Bereich eine Auswirkung auf die Erkennung und Prp4-Abhängigkeit des Introns haben. Im Folgenden werden in dem Bereich Mut1 Mutationen eingeführt, die in diesen 10 Nukleotiden jeweils zu einer Kombination von As und Us, As und Cs und As und Gs führen. Dabei werden die Nukleotide Uridin, Cytidin und Guanosin jeweils an den Positionen -4, -7, -12 und -13 eingefügt. An den restlichen Positionen befinden sich weiterhin Adenosin-Nukleotide. Mit Hilfe der RT-PCR wird dann im Vergleich mit dem Allel *res1'*-WT.K und *res1'*-Mut1A.K ermittelt, ob das Intron Prp4-abhängig oder -unabhängig gespleißt wird. Hierbei wird vor allem darauf geachtet wie sich das Verhältnis von prä-mRNA und mRNA nach Zugabe des Inhibitors der Prp4_{as2} Kinase verändert (Abbildung 32-37).

5.5.1 Kombinationen von As und Us in Mut1 resultieren in einem Prp4 Kinase-unabhängig gespleißten Intron

Zuerst wurden verschiedene Kombinationen aus As und Us in dem Bereich Mut1 untersucht. Das Allel *res1'*-Mut1A.K, bei dem von Position -4 bis -13 As zu finden sind, wird wie zuvor beschrieben Prp4-unabhängig gespleißt. Allerdings verschlechtert sich nach Inhibition der Prp4 Kinase die Spleißeffizienz. Werden an den Positionen -4 und -7 Us anstelle von As (*res1'*-Mut1.1.K) eingefügt, wird das Intron weiterhin Prp4-unabhängig gespleißt und es ist nur eine leichte Verschlechterung der Spleißeffizienz nach Inhibition von Prp4 Kinase zu beobachten. Die Spleißeffizienz wird nach Inhibition der Kinase weiter verschlechtert, wenn zusätzlich zu den Positionen -4 und -7 auch noch an den Positionen -12 und -13 Us eingefügt werden. Dieses Allel, *res1'*-Mut1.2.K, wird aber immer noch Prp4-unabhängig gespleißt. Erst wenn an allen Positionen, -4 bis -13, Us eingefügt sind, wird das Intron

Prp4-abhängig gespleißt und das Allel *res1⁻Mut1U.K* zeigt das typische Spleiß-Inhibitionsmuster (Abbildung 32).

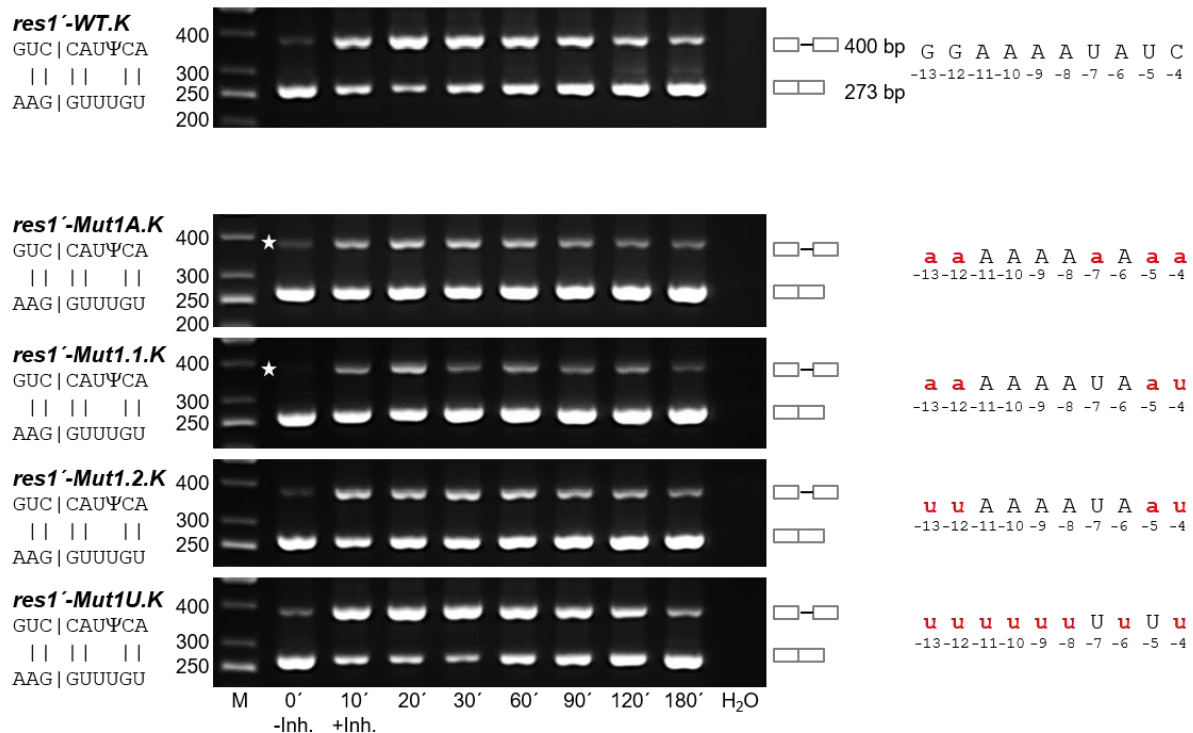


Abbildung 32| Variationen von As und Us im Bereich Mut1 werden weiterhin Prp4-unabhängig gespleißt aber verändern die Spleißeffizienz nach Inhibition von Prp4 Kinase

Die RT-PCR zeigt, dass die Variationen von As und Us in dem Bereich Mut1 weiterhin Prp4-unabhängig gespleißt werden (*res1⁻Mut1.1.K* + *res1⁻Mut1.2.K*) wie das Allel *res1⁻Mut1A.K*. Nur wenn alle Nukleotide in Us mutiert wurden, wird das Intron Prp4-abhängig gespleißt (*res1⁻Mut1U.K*). M, Größenstandard; H₂O, Kontrollreaktion ohne RNA als Template; Rechts: schematische Darstellung von prä-mRNA sowie mRNA und die gesetzten Mutationen. Mutierte Basen sind dick gedruckt, rot und mit kleinen Buchstaben hervorgehoben. Die Positionen sind angegeben. Links: Größenangaben des Standards und schematische Darstellung der Basenpaarung der U1 snRNA und Exon1/5'-SS; Ψ, Pseudouridin; |, Watson-Crick Basenpaarung; *, markiert die Position des zu erwartenden prä-mRNA Fragments.

5.5.2 Kombinationen von As und Cs in Mut1 können wieder zu einem Prp4 Kinase-abhängigen Intron führen

Die Kombinationen von As und Cs zeigen, dass das Einfügen von Cs dazu führen kann, dass das Intron wieder Prp4-abhängig gespleißt wird. Das Einfügen von einem C an Position -4 (*res1⁻Mut1.3.K*) resultiert in einer Verschlechterung der Spleißeffizienz nach Inhibition der Prp4_{as2} Kinase. Die Inhibition der Kinase führt dazu, dass die prä-mRNA so stark akkumuliert, dass in etwa gleich viel mRNA und prä-mRNA nach Inhibition vorliegt. Ohne Inhibition von Prp4 Kinase wird das Intron effizient herausgespleißt. Werden mindestens zwei Cs in diesem Bereich an den Positionen -4 und -7 eingefügt (*res1⁻Mut1.4.K*), oder vier Cs an Positionen -4, -7, -12 und -13 (*res1⁻Mut1.5.K*), wird das Intron, genauso wie bei dem

II Ergebnisse

Allel *res1⁻Mut1C.K*, Prp4-abhängig gespleißt. Zum Zeitpunkt 0 ohne Inhibition der Prp4 Kinase werden die Introns der Allele effizient gespleißt. Nach Inhibition der Kinase akkumuliert prä-mRNA von 10 Min. bis ca. 90. Min nach Inhibition und es liegt mehr prä-mRNA als mRNA vor. Nach 90 Min. beginnt das Spleißen erneut und das Verhältnis von prä-mRNA und mRNA dreht sich wieder um (Abbildung 33).

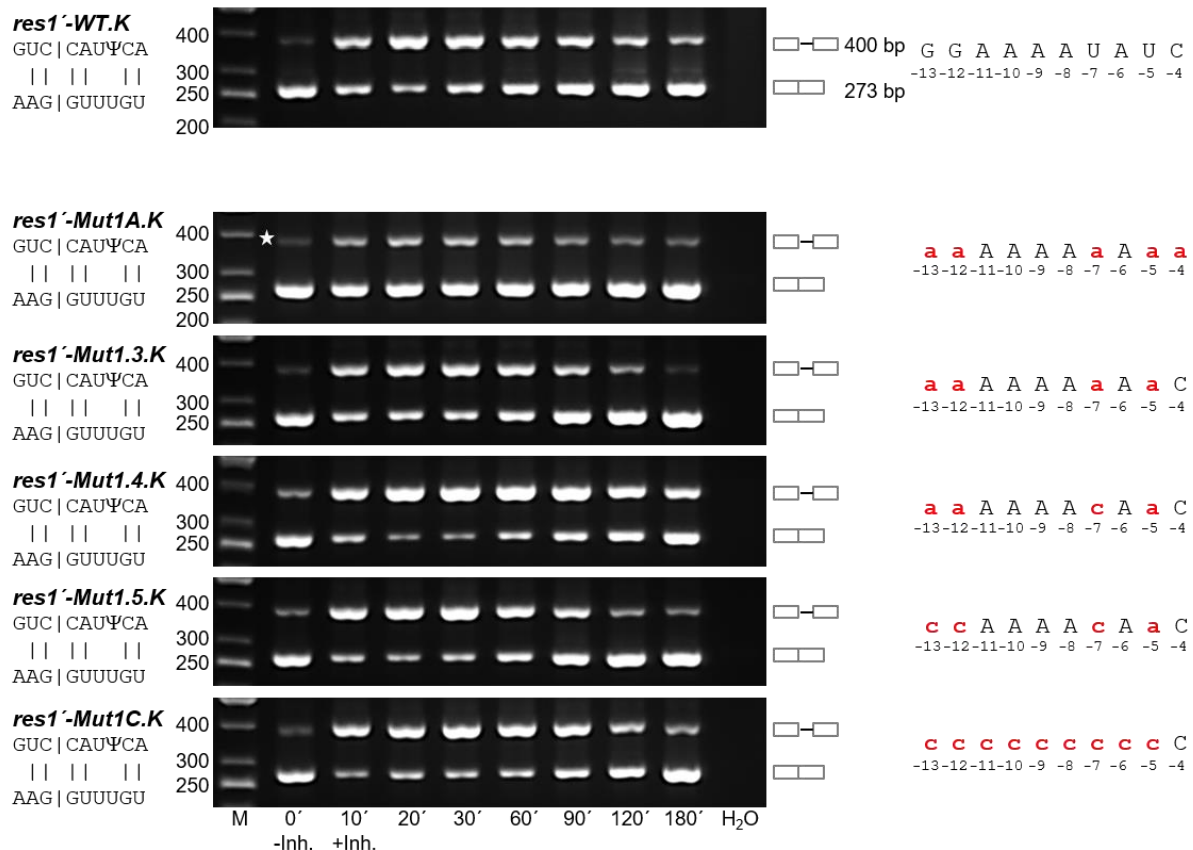


Abbildung 33| Das Einfügen von zwei Cs im Bereich Mut1A ist ausreichend, damit das Intron wieder Prp4-abhängig gespleißt wird

Die RT-PCR zeigt, dass ein eingefügte C zu einer schlechten Spleißeffizienz nach Inhibition der Kinase führt (*res1⁻Mut1.3.K*) und das Intron nicht mehr Prp4-unabhängig wie bei dem Allel *res1⁻Mut1A.K* gespleißt wird. Das Einfügen von mindestens zwei Cs in dem Bereich Mut1A führt zu einem Prp4-abhängig gespleißten Intron (*res1⁻Mut1.4.K* + *res1⁻Mut1.5.K* + *res1⁻Mut1C.K*). M, Größenstandard; H₂O, Kontrollreaktion ohne RNA als Template; Rechts: schematische Darstellung von prä-mRNA sowie mRNA und die gesetzten Mutationen. Mutierte Basen sind dick gedruckt, rot und mit kleinen Buchstaben hervorgehoben. Die Positionen sind angegeben. Links: Größenangaben des Standards und schematische Darstellung der Basenpaarung der U1 snRNA und Exon1/5'-SS; Ψ, Pseudouridin; |, Watson-Crick Basenpaarung; *, markiert die Position des zu erwartenden prä-mRNA.

Im Vergleich zu den Variationen von As und Us hat das Einfügen von Cs einen größeren Einfluss auf die Prp4-Abhängigkeit und zwei Cs sind bereits ausreichend, damit das Intron wieder Prp4-abhängig gespleißt wird.

5.5.3 Die Kombination von As und einem G in Mut1 ist ausreichend, damit das Intron wieder Prp4 Kinase-abhängig gespleißt wird

Nun sollte überprüft werden, ob das Einfügen von Gs an den gleichen Positionen auch die Prp4-Abhängigkeit des Introns verändert. Bei diesen Kombinationen ist schon das Einfügen von einem G ausreichend, damit das Intron wieder Prp4-abhängig gespleißt wird (Abbildung 34).

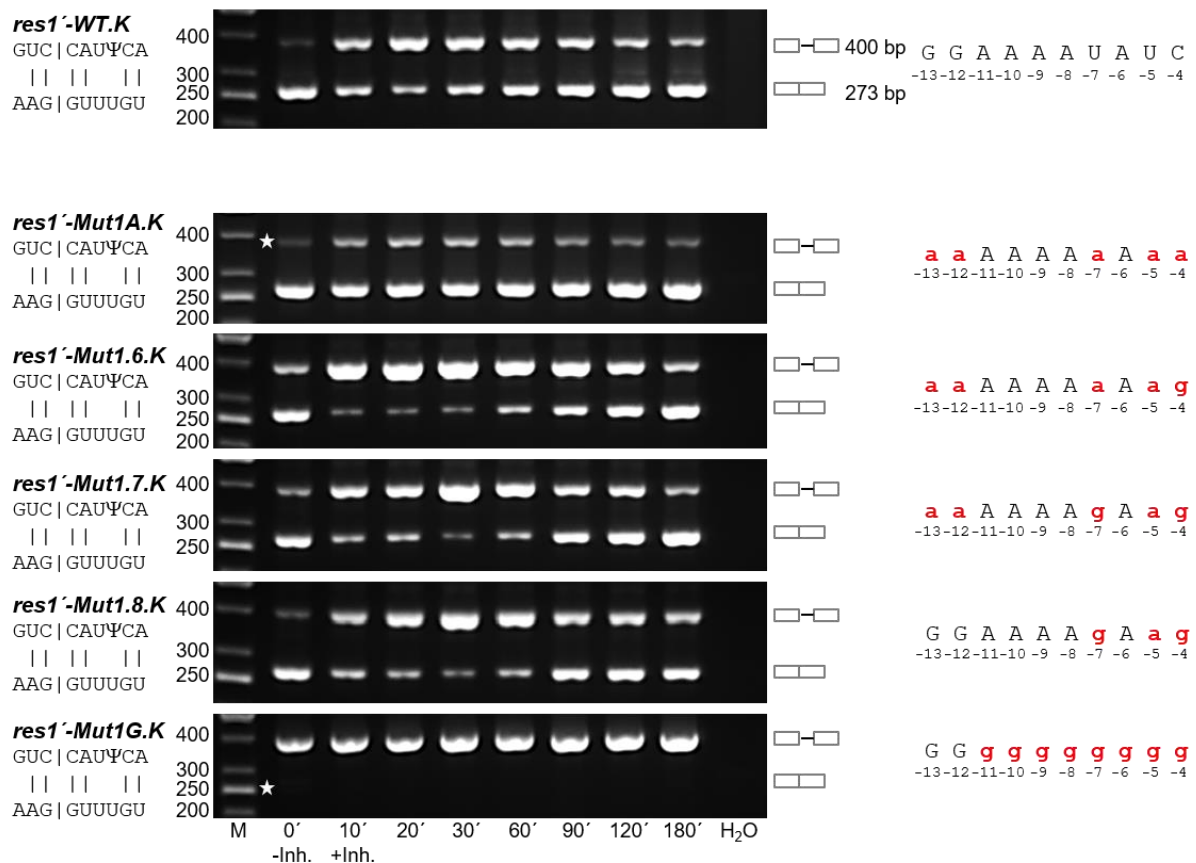


Abbildung 34| Das Einfügen von einem G im Bereich Mut1A ist ausreichend, damit das Intron wieder Prp4-abhängig gespleißt wird

Die RT-PCR zeigt, dass ein eingefügte G in dem Bereich Mut1A schon zu einem Prp4-abhängig gespleißten Intron führt (*res1'-Mut1.6.K*) und das Intron nicht mehr Prp4-unabhängig wie bei dem Allel *res1'-Mut1A.K* gespleißt wird. Weitere Gs verändern die Prp4-Abhängigkeit nicht (*res1'-Mut1.7.K* + *res1'-Mut1.8.K*). Erst wenn alle Positionen in diesem Bereich in Gs mutiert sind wird das Intron gar nicht mehr erkannt (*res1'-Mut1G.K*). M, Größenstandard; H₂O, Kontrollreaktion ohne RNA als Template; Rechts: schematische Darstellung von prä-mRNA sowie mRNA und die gesetzten Mutationen. Mutierte Basen sind dick gedruckt, rot und mit kleinen Buchstaben hervorgehoben. Die Positionen sind angegeben. Links: Größenangaben des Standards und schematische Darstellung der Basenpaarung der U1 snRNA und Exon1/5'-SS; Ψ, Pseudouridin; |, Watson-Crick Basenpaarung; *, markiert die Position des zu erwartenden prä-mRNA bzw. mRNA Fragments.

Als Vergleich ist wieder die RT-PCR von dem Allel *res1'-Mut1A.K* gezeigt, das Prp4-unabhängig gespleißt wird. Wird ein G an Position -4 in Mut1A eingefügt (*res1'-Mut1.6.K*) ist diese Mutation ausreichend, damit das Intron wieder Prp4-abhängig gespleißt wird. Das Intron wird zum Zeitpunkt 0 ohne Inhibition von Prp4 effizient gespleißt.

Nach Inhibition der Prp4 Kinase akkumuliert prä-mRNA von 10 Min. bis 90 Min. sehr stark und die mRNA Bande verschwindet im Gegensatz zu dem Allel *res1'-WT.K* fast vollständig. Nach 90 Min. beginnt das Spleißen erneut. Genau das gleiche Spleiß-Inhibitions muster ist zu finden, wenn zwei Gs an den Positionen -4 und -7 (*res1'-Mut1.7.K*) oder wenn vier Gs an den Positionen -4, -7, -12 und -13 (*res1'-Mut1.8.K*) eingefügt werden. Ist der gesamte Bereich Mut1 in Gs mutiert (*res1'-Mut1G.K*), wird das Intron wie zuvor beschrieben nicht mehr erkannt und es wird nur die prä-mRNA Bande auch zum Zeitpunkt 0 detektiert (Abbildung 34).

Werden die Nukleotid-Kombinationen in dem Bereich Mut1 miteinander verglichen fällt auf, dass das Einfügen von Us kaum einen Einfluss auf die Prp4-Unabhängigkeit hat, während das Einfügen von mindestens zwei Cs wieder zu Prp4-Abhängigkeit führt und das Einfügen von nur einem G sogar schon ausreichend ist, dass das Intron Prp4-abhängig gespleißt wird. Somit kann gesagt werden, dass schon Punktmutationen in dem Bereich Mut1A dazu führen können, dass das Intron wieder Prp4-abhängig gespleißt wird. Dabei haben Us nur einen schwache Auswirkung, Cs einen starken und Gs den stärksten Einfluss sowohl auf die Prp4 Kinase-Abhängigkeit des Introns als auch auf die Intronerkennung.

5.5.4 Mutationen an den Positionen -12 und -13 in dem Bereich Mut1 haben kaum Konsequenzen für die Prp4 Kinase-Abhängigkeit

Im nächsten Schritt sollte die Veränderung der Positionen -12 und -13 und die daraus resultierenden Folgen in Bezug auf die Prp4-Abhängigkeit untersucht werden. Als Grundlage wird bei diesen Mutationen das Allel *res1'-Mut1.1.K* verwendet. Bei diesem Allel befinden sich im Bereich Mut1 acht As, während dazwischen an den Positionen -4 und -7 Us zu finden sind. Dieses Allel wird wie zuvor beschrieben Prp4-unabhängig gespleißt. Es sollte nun der Einfluss der Positionen -12 und -13 auf die Prp4-Abhängigkeit getestet werden, an denen bei diesem Allel As zu finden sind (Abbildung 35).

Als Vergleich ist auch die RT-PCR des Prp4-abhängigen *res1'-WT.K* Allels gezeigt. Werden die As an den Positionen -12 und -13 in Us mutiert (*res1'-Mut1.2.K*), wird zwar die Spleißeffizienz nach Inhibition der Kinase etwas verschlechtert, aber das Intron wird immer noch Prp4-unabhängig gespleißt. Wenn an diesen Positionen Cs (*res1'-Mut1.9.K*) oder Gs (*res1'-Mut1.10.K*) eingefügt werden führt das dazu, dass nach Inhibition der Kinase prä-mRNA so stark akkumuliert, dass in etwa gleich viel prä-mRNA wie mRNA zu finden ist. Nach ca. 90 Min. beginnt Spleißen erneut (Abbildung 35). Es kann zusammenfassend gesagt werden, dass Mutationen der Positionen -12 und -13 die Spleißeffizienz nach Inhibition der Prp4_{as2} Kinase verändern und somit einen leichten Einfluss auf die Prp4-Abhängigkeit haben. Allerdings werden die Introns der Allele nicht vollständig

Prp4-abhängig gespleißt, was bedeuten würde, dass nach Inhibition der Prp4_{as2} Kinase mehr prä-mRNA als mRNA vorliegen würde.

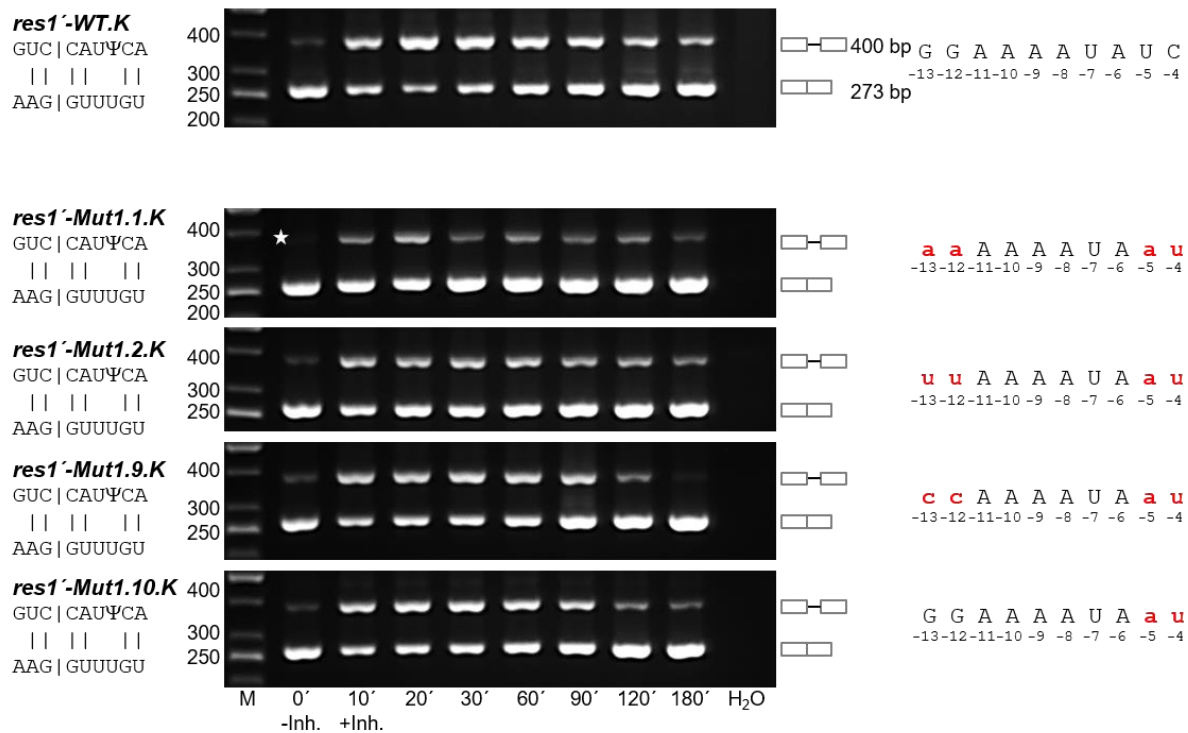


Abbildung 35| Mutationen an den Positionen -12 und -13 zeigen einen schwachen Einfluss auf die Prp4-Abhängigkeit

Die RT-PCR zeigt, dass zwei eingefügte Us an den Positionen -12 und -13 nur die Spleißeffizienz des Introns nach Inhibition von Prp4 Kinase verschlechtern (*res1'-Mut1.2.K*) aber das Intron weiterhin Prp4-unabhängig wie bei dem Allel *res1'-Mut1.1.K* gespleißt wird. Das Einfügen von Cs oder Gs an diesen Positionen führt dazu, dass nach Inhibition der Kinase ein Verhältnis von prä-mRNA zu mRNA von etwa 50:50 vorliegt und die Spleißeffizienz damit drastisch verschlechtert ist (*res1'-Mut1.9.K* + *res1'-Mut1.10.K*). M, Größenstandard; H₂O, Kontrollreaktion ohne RNA als Template; Rechts: schematische Darstellung von prä-mRNA sowie mRNA und die gesetzten Mutationen. Mutierte Basen sind dick gedruckt, rot und mit kleinen Buchstaben hervorgehoben. Die Positionen sind angegeben. Links: Größenangaben des Standards und schematische Darstellung der Basenpaarung der U1 snRNA und Exon1/5'-SS; Ψ, Pseudouridin; |, Watson-Crick Basenpaarung; *, markiert die Position des zu erwartenden prä-mRNA Fragments.

5.5.5 Position -4 ist entscheidend, ob ein Intron Prp4-unabhängig oder Prp4-abhängig gespleißt wird

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Positionen -12 und -13 nur leicht die Prp4-Abhängigkeit verändern, sollte nun überprüft werden, ob die Position direkt oberhalb der AAG/5'-SS eine größere Auswirkung auf das Spleißverhalten des Introns hat. Deswegen wurde Position -4 in U, C und G mutiert. Dabei wurde als Grundlage für diese Mutationen wiederum das Allel *res1'-Mut1.1.K* genommen, das an Position -4 und -7 ein U hat. An den restlichen Positionen sind As zu finden. Dieses Allel wird wie zuvor beschrieben Prp4-unabhängig gespleißt. Als Vergleich ist die RT-PCR des Prp4-abhängigen *res1'-WT.K* zu sehen. Wird die Position -4 in ein C mutiert, wird das Intron zum Zeitpunkt 0 effizient

II Ergebnisse

gespleißt. Nach Inhibition der Kinase akkumuliert prä-mRNA und die Spleißeffizienz ist verschlechtert, aber es liegt in etwa genauso viel prä-mRNA wie mRNA vor, sodass dieses Allel, *res1⁻Mut1.11.K*, noch nicht als Prp4-abhängig bezeichnet werden kann. Wird die Position -4 in ein G mutiert, wird das Intron zum Zeitpunkt 0 ohne Inhibition von Prp4 Kinase gespleißt, aber nach Inhibition der Kinase ist das typische Spleiß-Inhibitionsmuster zu beobachten (*res1⁻Mut1.12.K*). Es akkumuliert prä-mRNA von 10 Min. bis ca. 90 Min. nach Inhibition der Kinase bevor sich das Verhältnis von prä-mRNA zu mRNA wieder umkehrt und Spleißen stattfindet. Die Akkumulation von prä-mRNA ist sehr stark und im Vergleich zum Allel *res1⁻WT.K* verschwindet die mRNA des Allels *res1⁻Mut1.12.K* von 10 Min. bis 60 Min. nach Inhibition fast vollständig (Abbildung 36).

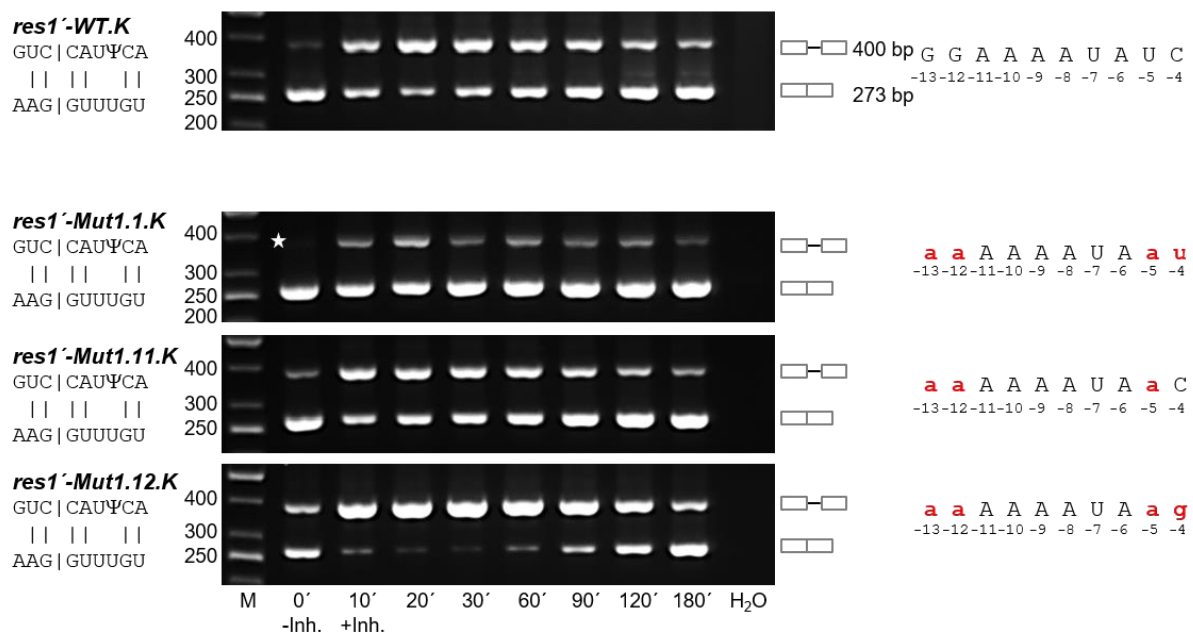


Abbildung 36| Mutationen an der Position -4 führen dazu, dass das Intron wieder Prp4-abhängig gespleißt wird

Die RT-PCR zeigt, dass ein eingefügtes Us an der Position -4 nur die Spleißeffizienz des Introns nach Inhibition von Prp4 leicht verschlechtert (*res1⁻Mut1.1.K*), aber das Intron Prp4-unabhängig gespleißt wird. Das Einfügen von einem C an dieser Position führt dazu, dass nach Inhibition der Kinase ein Verhältnis von prä-mRNA zu mRNA von etwa 50:50 vorliegt und die Spleißeffizienz damit drastisch verschlechtert ist (*res1⁻Mut1.11.K*). Wird diese Position in ein G mutiert (*res1⁻Mut1.12.K*), wird das Intron Prp4-abhängig gespleißt. M, Größenstandard; H₂O, Kontrollreaktion ohne RNA als Template; Rechts: schematische Darstellung von prä-mRNA sowie mRNA und die gesetzten Mutationen. Mutierte Basen sind dick gedruckt, rot und mit kleinen Buchstaben hervorgehoben. Die Positionen sind angegeben. Links: Größenangaben des Standards und schematische Darstellung der Basenpaarung der U1 snRNA und Exon1/5'-SS; Ψ, Pseudouridin; |, Watson-Crick Basenpaarung; *, markiert die Position des zu erwartenden prä-mRNA Fragments.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass durch Mutationen der Position -4 drei verschiedene Zustände erreicht werden können, die den Bereich zwischen Prp4-Unabhängigkeit und -Abhängigkeit verdeutlichen. Bei einem U an dieser Position, wird das Intron Prp4-unabhängig gespleißt, bei einem C verschlechtert sich die Spleißeffizienz

nach Inhibition der Kinase und bei einem G wird das Intron Prp4-abhängig gespleißt und prä-mRNA akkumuliert sehr stark, wobei die mRNA fast vollständig verschwindet.

In dieser Versuchsreihe entspricht der Bereich Mut1 nicht der Wildtyp-Sequenz, sondern die Positionen -12 und -13 enthalten As anstelle von Gs und Position -5 ein A anstelle von einem U. Deshalb sollte im nächsten Schritt überprüft werden, ob die Position -4 auch so einen starken Einfluss auf die Prp4 Kinase-Abhängigkeit hat, wenn die restliche Sequenz der Wildtyp-Sequenz entspricht.

Das Allel *res1*^{-WT.K} zeigt die Wildtyp-Sequenz, die an Position -4 ein C hat. Als erstes wurde diese Position in ein A mutiert. Dieses Allel, *res1*^{-Mut1.13.K}, wird Prp4-unabhängig gespleißt. Zum Zeitpunkt 0 wird das Intron effizient herausgespleißt und auch nach Inhibition der Kinase liegt zu allen Zeitpunkten mehr mRNA als prä-mRNA vor. Es ist allerdings eine leichte Verschlechterung der Spleißeffizienz nach Inhibition der Kinase zu finden. Das heißt, dass nach Inhibition der Kinase eine kleine Anzahl von Transkripten nicht mehr gespleißt wird und die prä-mRNA Bande etwas stärker zu sehen ist. Wird die Position -4 in ein U mutiert (*res1*^{-Mut1.14.K}), akkumuliert mehr prä-mRNA als bei der Mutation in ein A. Nach Inhibition der Kinase liegt in etwa genauso viel prä-mRNA wie mRNA vor, sodass die Spleißeffizienz eindeutig verschlechtert, aber das Intron scheinbar noch nicht Prp4-abhängig gespleißt wird. Das Wildtyp-Allel, *res1*^{-WT.K}, das ein C an dieser Position hat, wird wie zuvor beschrieben Prp4-abhängig gespleißt. Auch eine Mutation der Position -4 in ein G führt dazu, dass das Intron Prp4-abhängig gespleißt wird (*res1*^{-Mut1.15.K}) (Abbildung 37).

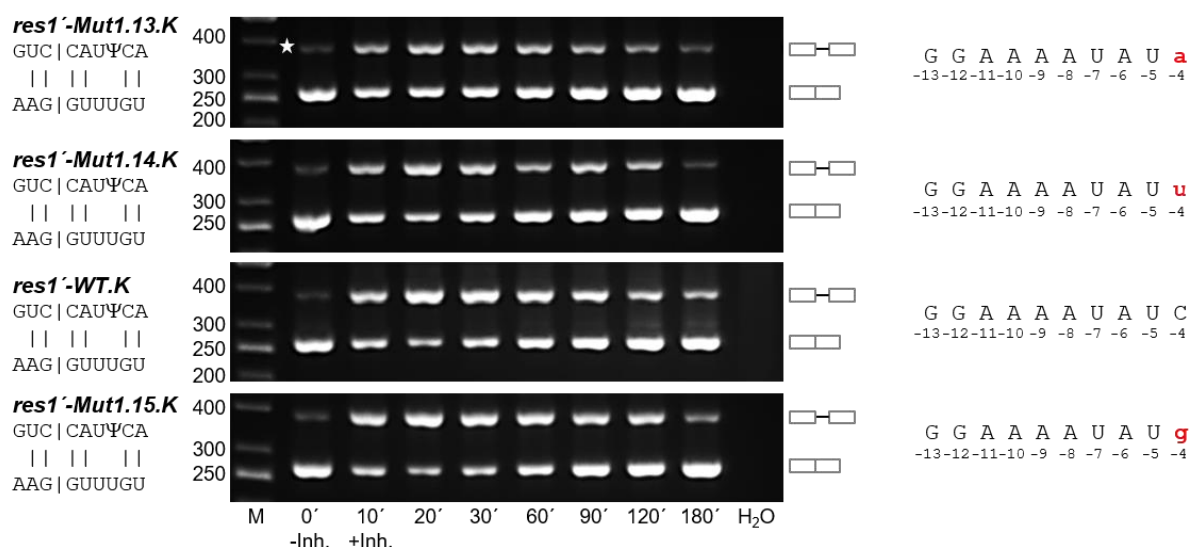


Abbildung 37/ Position -4 ist bei dem *res1*⁻-Reportergen entscheidend, ob das Intron Prp4-abhängig oder -unabhängig gespleißt wird

Die RT-PCR zeigt, dass eine Mutation der Position -4 in ein A dazu führt, dass das Intron Prp4-unabhängig gespleißt wird (*res1*^{-Mut1.13.K}). Das Einfügen von einem U an dieser Position führt dazu, dass nach Inhibition der Kinase ein Verhältnis von prä-mRNA zu mRNA von etwa 50:50 vorliegt und die Spleißeffizienz damit drastisch verschlechtert ist (*res1*^{-Mut1.14.K}). Liegt an dieser Position ein C oder G vor (*res1*^{-WT.K} + *res1*^{-Mut1.15.K}), wird das Intron Prp4-abhängig

II Ergebnisse

gespleißt. M, Größenstandard; H₂O, Kontrollreaktion ohne RNA als Template; Rechts: schematische Darstellung von prä-mRNA sowie mRNA und die gesetzten Mutationen. Mutierte Basen sind dick gedruckt, rot und mit kleinen Buchstaben hervorgehoben. Die Positionen sind angegeben. Links: Größenangaben des Standards und schematische Darstellung der Basenpaarung der U1 snRNA und Exon1/5'-SS; Ψ, Pseudouridin; |, Watson-Crick Basenpaarung; *, markiert die Position des zu erwartenden prä-mRNA Fragments.

Es konnte somit gezeigt werden, dass das Nukleotid an Position -4 des *res1'*-Reportergens entscheidend ist, ob das Intron Prp4-abhängig oder -unabhängig gespleißt wird. Wird nur diese Position mutiert, wird das Intron entweder Prp4-unabhängig gespleißt (*res1'-Mut1.13.K*), die Spleißeffizienz ist nach Inhibition von Prp4 Kinase beeinflusst (*res1'-Mut1.14.K*) oder das Intron wird Prp4-abhängig gespleißt (*res1'-WT.K* + *res1'-Mut1.15.K*). In diesem Fall sind die Stärke der Akkumulation von prä-mRNA und der Grad des Verschwindens von mRNA mit dem Wildtyp-Allel vergleichbar (Abbildung 37, S. 67). Interessanterweise haben Mutationen an dieser Position eine andere Auswirkung auf die Stärke der Akkumulation von prä-mRNA und das Verschwinden von mRNA, wenn die restlichen Positionen nicht der Wildtyp-Sequenz entsprechen. Einerseits kann es sein, dass die Akkumulation von prä-mRNA nicht so stark ist, wenn zusätzlich zu der Position -4 noch andere Positionen mutiert sind, wie es bei *res1'-Mut1.11.K* im Vergleich zu *res1'-WT.K* zu finden ist. Andererseits können aber zusätzliche Mutationen zu stärkerer und längerer Akkumulation von prä-mRNA und zu einem kompletten Verschwinden der mRNA führen, was bei einem Vergleich von *res1'-Mut1.12.K* mit *res1'-Mut1.15.K* zu beobachten ist (Abbildung 36, S. 66 + Abbildung 37, S. 67). Das zeigt eindeutig, dass die gesamte Sequenz in dem Bereich Mut1 einen Einfluss darauf hat, ob ein Intron Prp4-abhängig oder -unabhängig gespleißt wird.

5.6 Konstruktion des *trs402'*-Reportergens

Neben *res1* wurde außerdem das Prp4-unabhängig gespleißte Gen *trs402* als Reporter verwendet. Dabei wurde zuerst untersucht, ob Mutationen in Exon1 oberhalb der X₃X₂X₁/5'-SS das Prp4-unabhängig gespleißte Intron des *trs402* Gens nicht beeinflussen. Im nächsten Schritt wurde die 5'-SS dieses Gens mutiert, sodass das Intron Prp4-abhängig gespleißt wird. Auch hier wurden dann die Positionen -4 bis -14 in Exon1 mutiert, um die Folge auf die Prp4-Abhängigkeit zu untersuchen. Dieses Reportergen wurde ebenfalls durch gerichtete Mutagenese verändert und anschließend über die Schnittstellen *Bam*HI und *Sal*I in den Vektor pML81HA subkloniert. Bei der Konstruktion wurde wie bei *res1'* eine Leserasterverschiebung eingefügt, sodass kein funktionsfähiges Trs402'-Protein gebildet werden kann. Abschließend wurde der Integrationsvektor pML81HA-*trs402'* ebenfalls mit *Bs*WI im *leu1*⁺-Gen des Vektors linearisiert und in den *leu1*-Lokus der Hefe integriert (Abbildung 38). Zur Untersuchung der Spleißeffizienz wurde wiederum zu verschiedenen Zeitpunkten RNA isoliert und anschließend eine semiquantitative RT-PCR durchgeführt.

Dafür wurden die Primer so gewählt, dass ausschließlich die Spleißeffizienz des *trs402*⁺-Gens oder des *trs402*⁻-Reportergens betrachtet wird. Dies ist möglich, indem der Vorwärts-Primer genau dort bindet und endet, wo sich die *NcoI*-Schnittstelle im Reportertranskript befindet.

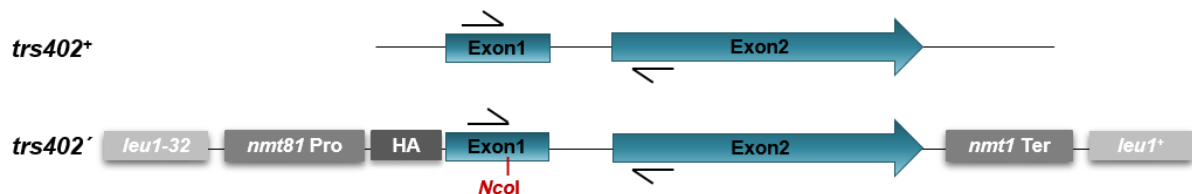


Abbildung 38| Die Allele, *trs402*⁺ und *trs402*⁻, liegen beide in der Zelle vor

Schematische Darstellung der beiden Allele *trs402*⁺ im *trs402*-Lokus und *trs402*⁻ im *leu1*-Lokus im Vergleich. Die Pfeile kennzeichnen die Positionen der verwendeten Primer in der RT-PCR. Die *NcoI* Schnittstelle wird für die Unterscheidung zwischen den beiden Transkripten während der RT-PCR benötigt.

5.7 Das Intron des Allels *trs402*⁻-WT.N zeigt auch im *leu1*-Lokus ein Prp4 Kinase-unabhängiges Spleißverhalten

Zuerst sollte überprüft werden, ob *trs402*⁻-WT.N im *leu1*-Lokus weiterhin Prp4-unabhängig gespleißt wird und die Primer spezifisch das Reportertranskript amplifizieren. Dazu wurden die Primer, wie zuvor erwähnt, so gewählt, dass bei der RT-PCR ausschließlich eines der beiden Gene betrachtet werden kann. Für prä-mRNA entsteht dabei ein Fragment von 334 bp und für mRNA liegt die Größe bei 189 bp (Abbildung 39).

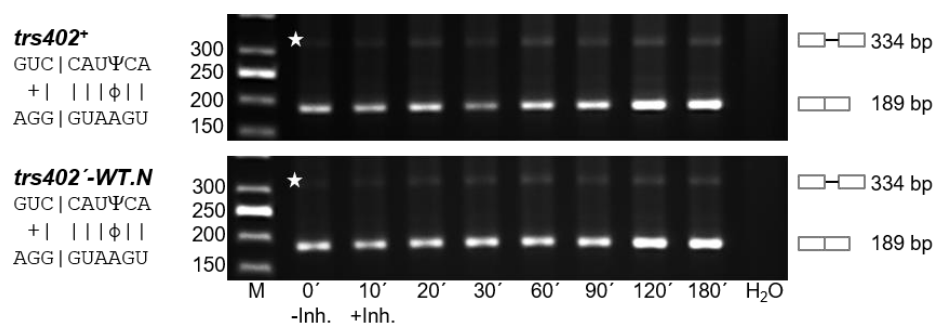


Abbildung 39| Die Transkripte *trs402*⁺ und *trs402*⁻-WT.N werden beide Prp4-unabhängig gespleißt

Die beiden Transkripte *trs402*⁺ (Stamm 812) und *trs402*⁻-WT.N (Stamm 1273) zeigen beide ohne Inhibition der Prp4 Kinase (-Inh.) und auch nach Inhibition (+Inh.) hauptsächlich mRNA. M, Größenstandard; H₂O, Kontrollreaktion ohne RNA als Template; Rechts: schematische Darstellung von prä-mRNA sowie mRNA mit den zu erwartenden Fragmentgrößen. Links: Größenangaben des Standards und schematische Darstellung der Basenpaarung der U1 snRNA und Exon1/5'-SS; Ψ, Pseudouridin; |, Watson-Crick Basenpaarung; +, G-U Basenpaarung; φ, A-Ψ Paarung; *, markiert die Position des zu erwartenden prä-mRNA Fragments.

Beide Transkripte, *trs402*⁺ und *trs402*^{-WT.N}, können mit der U1 snRNA acht von neun möglichen komplementäre Basenpaarungen an der AGG/5'-SS eingehen. Sechs Basenpaarungen liegen dabei in der 5'-SS an Position +1 bis +6 und zwei an Position -1 und -2 im Exon1. Dabei ist die Interaktion an Position -2 zwischen einem Guanin und einem Uracil eine Wobble-Basenpaarung. Diese Interaktion ist ausreichend, um sowohl ohne als auch mit Inhibition der Prp4_{as2} Kinase, sowohl bei *trs402*⁺ (Stamm 812) als auch bei *trs402*^{-WT.N} (Stamm 1273), das Intron effizient herauszuspleißen. Der Stamm 812 besitzt ausschließlich das *trs402*⁺. Der Stamm 1273 hat zusätzlich zu dem *trs402*⁺ ein *trs402*^{-WT.N} im *leu1*-Lokus. Die verwendeten Primer detektieren ausschließlich das *trs402*^{-WT.N} im *leu1*-Lokus. Auch dieses Reportertranskript wird Prp4-unabhängig gespleißt. Damit verhält sich das Prp4-unabhängige *trs402*^{-WT.N} im *leu1*-Lokus wie das *trs402*⁺ und kann als Reportergen verwendet werden.

5.8 Mutationen in Exon1 oberhalb der AGG/5'-SS des Prp4 Kinase-unabhängigen *trs402*^{-WT.N}-Reportergens verändern das Spleißverhalten des Introns nicht

In Abbildung 40 ist eine Übersicht der gesetzten Mutationen oberhalb der AGG/5'-SS des Prp4-unabhängigen *trs402*⁻-Reportergens zu finden.

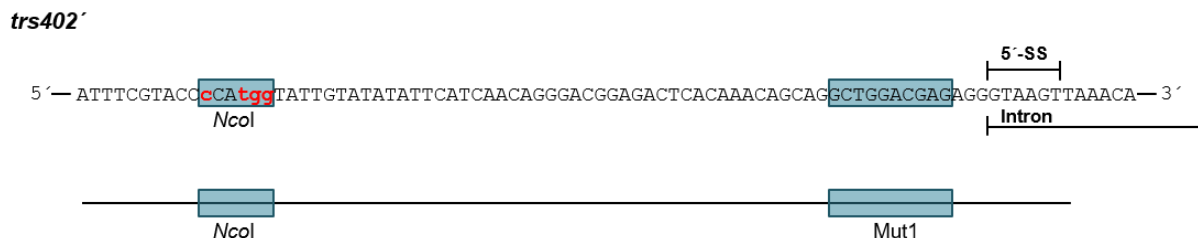


Abbildung 40| Übersicht der gesetzten Mutationen oberhalb der AGG/5'-SS des Prp4-unabhängigen *trs402*⁻-Reportergens

Durch die gerichtete *in vitro* Mutagenese nach Kunkel wurde der Bereich Mut1 (blauer Kasten) in As, Cs, Gs oder Us mutiert. Außerdem wurde eine NcoI-Schnittstelle eingefügt, um die positiven Plasmide identifizieren und in der RT-PCR zwischen den Allelen *trs402*⁺ im *trs402*-Lokus und *trs402*⁻ im *leu1*-Lokus unterscheiden zu können. Markiert ist außerdem der Intronanfang mit der 5'-SS. 5'-SS, 5'-Spleißstelle.

Es wurden jeweils 10 Nukleotide im Bereich Mut1 in Cs, Us, As oder Gs mutiert. Die letzten drei Nukleotide in Exon1 (AGG) wurde dabei nicht verändert, da diese wie zuvor beschrieben eine Interaktion mit der U1 snRNA eingehen und Mutationen in diesem Bereich die Prp4-Abhängigkeit beeinflussen.

5.8.1 Mutationen in Exon1 des Prp4-unabhängigen Reportergens *trs402'*-WT.N beeinflussen die Erkennung und Prp4 Kinase-Unabhängigkeit des Introns nicht

Als erstes wurden die 10 Nukleotide direkt oberhalb der AGG/5'-SS von Position -4 bis -13 (Mut1) in Cs, Us, As und Gs mutiert. Zum Vergleich ist das Allel *trs402'-WT.N* mit der Wildtyp-Sequenz in Bereich Mut1 gezeigt. Die RT-PCR zeigt, dass das Intron zu allen Zeitpunkten effizient herausgespleißt wird (Abbildung 41 A).

A

trs402'-WT.N

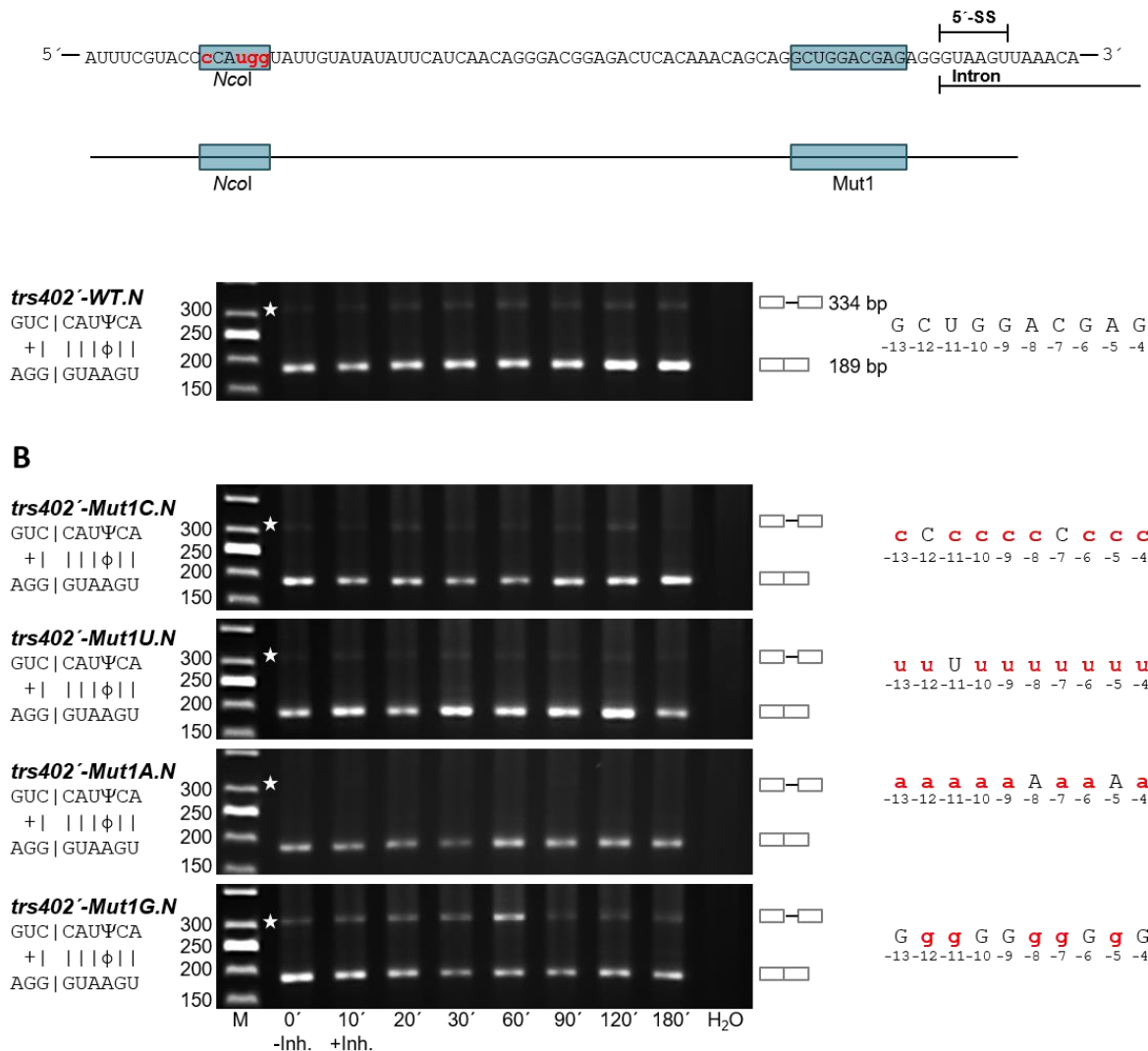


Abbildung 41| Mutationen in dem Bereich Mut1 beeinflussen die Prp4-Unabhängigkeit des Prp4-unabhängigen *trs402*^{-WT.N}-Reportergens nicht

(A) Schematische Darstellung des zu mutierenden Bereichs Mut1 und die RT-PCR des Prp4-unabhängigen Allels *trs402⁻WT.N*. (B) Gezeigt ist die RT-PCR der gesetzten Mutationen in Bereich Mut1. Dabei wurden alle Nukleotide in diesem Bereich in Cs, Us, As oder Gs mutiert. Die RT-PCR zeigt, dass die Mutationen in diesem Bereich keinen Einfluss auf das Prp4-unabhängige *trs402⁻WT.N* Reportergen haben. Alle Allele werden weiterhin Prp4-unabhängig, auch nach Inhibition der Kinase (+Inh.), gespleißt (*trs402⁻Mut1C.N* + *trs402⁻Mut1U.N* + *trs402⁻Mut1A.N* + *trs402⁻Mut1G.N*). M, Größenstandard; H₂O, Kontrollreaktion ohne RNA als Template; Rechts: schematische Darstellung von prä-mRNA sowie mRNA und die gesetzten Mutationen. Mutierte Basen sind dick gedruckt, rot und mit kleinen Buchstaben hervorgehoben. Die Positionen sind angegeben. Links: Größenangaben des Standards und schematische Darstellung der Basenpaarung der U1 snRNA und Exon1/5'-SS; Ψ, Pseudouridin; |, Watson-Crick Basenpaarung; +, G-U Basenpaarung; ϕ, A-Ψ Paarung; *, markiert die Position des zu erwartenden prä-mRNA Fragments.

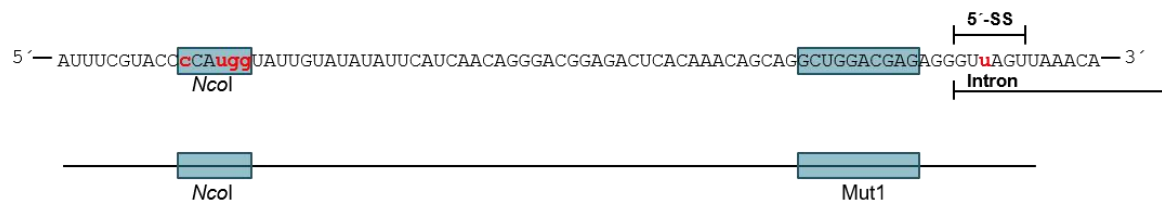
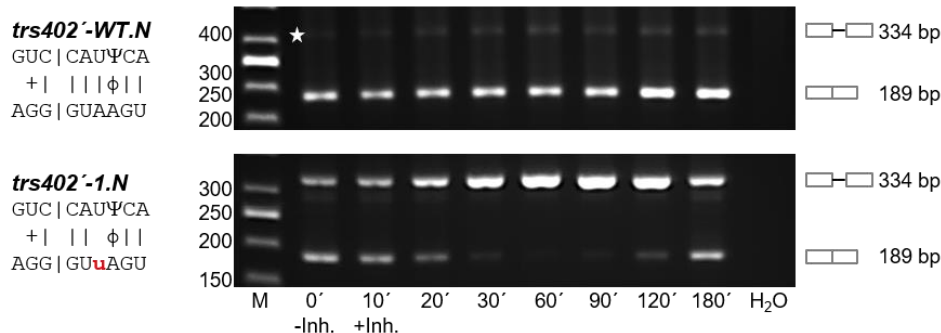
Alle betrachteten Allele zeigen ein ähnliches Spleißverhalten. Bei dem Allel *trs402'-Mut1C.N* wurden die Basen an den Positionen -4 bis -6, -8 bis -11 und -13 in Cs, bei dem Allel *trs402'-Mut1U.N*, wurden die Basen an den Positionen -4 bis -10 und -12 bis -13 in Us, bei dem Allel *trs402'-Mut1A.N* wurden die Basen an den Positionen -4, -6, -7 und -9 bis -13 in As und bei dem Allel *trs402'-Mut1G.N* wurden die Positionen -5, -7, -8, -11 und -12 in Gs mutiert. Die RT-PCRs zeigen, dass alle Allele Prp4-unabhängig gespleißt werden. Somit wird das Intron zu allen Zeitpunkten effizient herausgespleißt und es liegt mehr mRNA als prä-mRNA vor. Das Allel *trs402'-Mut1G.N* zeigt eine Beeinträchtigung der Spleißeffizienz. Das Intron wird bei diesem Allel schon zum Zeitpunkt 0 nicht so effizient gespleißt wie die anderen Allele. Das heißt es wird eine kleine Anzahl von Transkripten nicht mehr gespleißt und die prä-mRNA Bande ist etwas stärker zu sehen. Die Spleißeffizienz verschlechtert sich nach Inhibition der Kinase nicht, sodass zu allen Zeitpunkten weiterhin mehr mRNA als prä-mRNA vorliegt und das Intron somit Prp4-unabhängig gespleißt wird (Abbildung 41 B).

5.9 Mutationen in Exon1 oberhalb der AGG/5'-SS des Prp4-abhängigen Reportergens *trs402'-1.N* beeinflussen die Erkennung und Prp4 Kinase-Abhängigkeit des Introns

Im nächsten Schritt sollte nun das Prp4-unabhängige Intron des Allels *trs402'-WT.N*, durch Mutation der starken 5'-SS in eine schwache 5'-SS, in ein Prp4-abhängiges Intron umgewandelt werden. Anschließend sollte überprüft werden, ob Mutationen der 10 Nukleotide direkt oberhalb der AGG/5'-SS die Erkennung und Prp4-Abhängigkeit des Introns beeinflussen.

5.9.1 Eine fehlende Basenpaarung an Position +3 in der 5'-SS verwandelt das Intron von *trs402'-WT.N* in ein Prp4-abhängiges Intron

Zuerst wurde die starke 5'-SS des Reportergens *trs402'-WT.N* in eine schwache 5'-SS umgewandelt, sodass das Intron Prp4-abhängig gespleißt wird. Dafür wurde Position +3 der 5'-SS des Reportergens *trs402'-WT.N* in ein U mutiert, sodass an dieser Stelle keine Interaktion mit der U1 snRNA mehr stattfinden kann. Das Prp4-abhängige Allel *trs402'-1.N* wurde anschließend für die weiteren Mutationsanalysen verwendet. Dabei erfolgte die Mutagenese und Integration in das Genom analog zu dem Reportergen *trs402'-WT.N*. Der einzige Unterschied zwischen den beiden Reportergenen ist die Sequenz der 5'-SS (Abbildung 42 + Abbildung 41). Das Allel *trs402'-1.N* wird Prp4-abhängig gespleißt und es ist das typische Prp4-abhängige Spleiß-Inhibitionsmuster zu beobachten. Die RT-PCR zeigt, dass zum Zeitpunkt 0 die Spleißeffizienz bereits beeinträchtigt ist und in etwa genauso viel prä-mRNA wie mRNA vorliegt. Nach Inhibition der Prp4 Kinase akkumuliert nach 20 Min. prä-mRNA und Spleißen beginnt erst wieder 120 Min. nach Inhibition. Dabei verschwindet die mRNA Bande von 30 Min. bis 90 Min. fast vollständig (Abbildung 42 B).

A***trs402*^{-1.N}****B****Abbildung 42| Das Reportergen *trs402*^{-1.N} wird Prp4-abhängig gespleißt**

(A) Durch die gerichtete *in vitro* Mutagenese nach Kunkel wurde der Bereich Mut1 (blauer Kasten) in As, Cs, Gs oder Us mutiert. Außerdem wurde eine *NcoI*-Schnittstelle eingefügt, um die positiven Plasmide identifizieren und in der RT-PCR zwischen den Allelen *trs402*⁺ im *trs402*-Lokus und *trs402*⁻¹ im *leu1*-Lokus unterscheiden zu können. Markiert ist außerdem der Intronanfang mit der 5'-SS. 5'-SS, 5'-Spleißstelle. (B) Die RT-PCR zeigt, dass die Mutation an Position +3 zu einem Prp4-abhängig gespleißten Intron führt. M, Größenstandard; H₂O, Kontrollreaktion ohne RNA als Template; Rechts: schematische Darstellung von prä-mRNA sowie mRNA. Links: Größenangaben des Standards und schematische Darstellung der Basenpaarung der U1 snRNA und Exon1/5'-SS; Ψ, Pseudouridin; |, Watson-Crick Basenpaarung; +, G-U Basenpaarung; φ, A-Ψ Paarung; *, markiert die Position des zu erwartenden prä-mRNA Fragments. Mutierte Basen sind dick gedruckt, rot und mit kleinen Buchstaben hervorgehoben.

Das Allel *trs402*^{-1.N} wird als ein Prp4-abhängig gespleißtes Reportertranskript für weitere Mutationsanalysen verwendet.

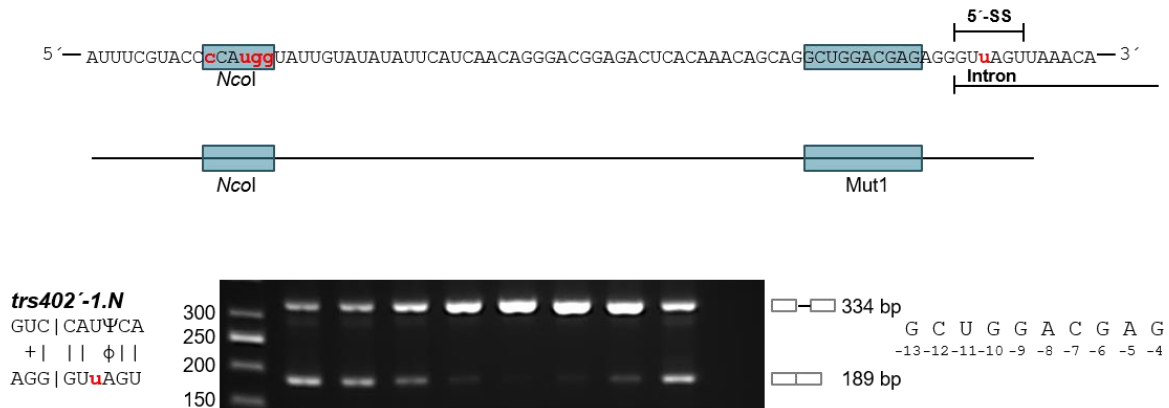
5.9.2 Mutationen in den letzten 10 Nukleotiden im Exon1 haben Auswirkungen auf die Erkennung und Prp4 Kinase-Abhängigkeit des Introns

Es wurden die 10 Nukleotide direkt oberhalb der AGG/5'-SS von Position -4 bis -13 (Mut1) in Cs, Us, As und Gs mutiert. Als Vergleich ist die RT-PCR des Allels *trs402*^{-1.N} mit der entsprechenden Wildtyp-Sequenz in Bereich Mut1 gezeigt. Die RT-PCR zeigt, dass das Intron Prp4-abhängig gespleißt wird (Abbildung 43 A).

II Ergebnisse

A

trs402^{-1.N}



B

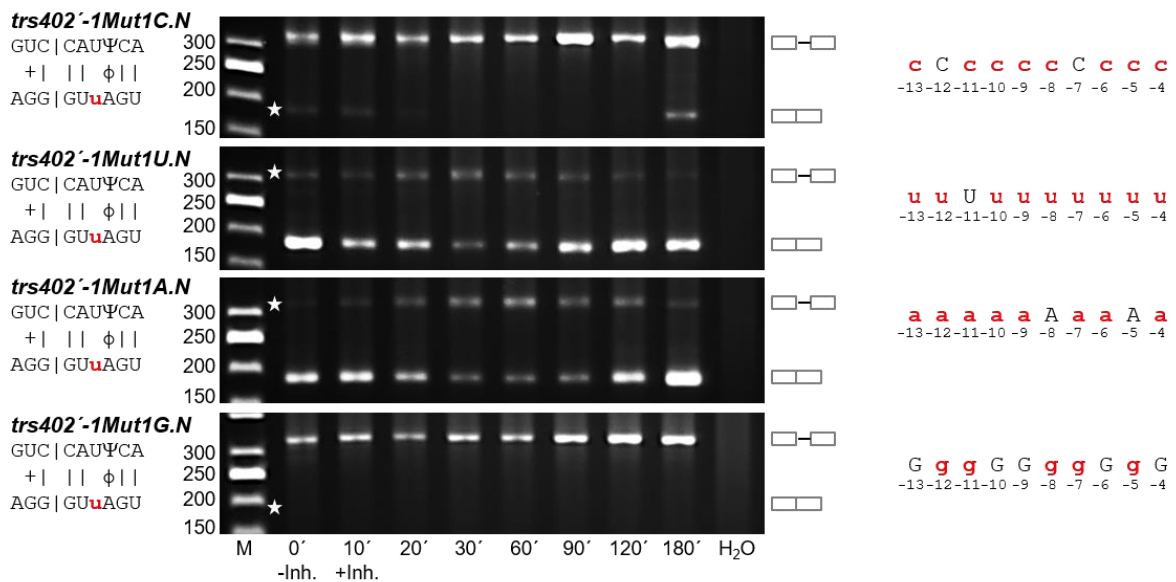


Abbildung 43| Mutationen in dem Bereich Mut1 haben Auswirkungen auf die Intronerkennung und Prp4-Abhängigkeit des Prp4-abhängigen *trs402*^{-1.N}-Reportergens

(A) Schematische Darstellung des zu mutierenden Bereichs Mut1 und die RT-PCR des Prp4-abhängigen Allels *trs402*^{-1.N}. (B) Gezeigt ist die RT-PCR der gesetzten Mutationen in Bereich Mut1. Dabei wurden alle Nukleotide in diesem Bereich in Cs, Us, As oder Gs mutiert. Die RT-PCR zeigt, dass die Mutationen in diesem Bereich unterschiedliche Einflüsse haben. Entweder wird das Intron Prp4-unabhängig gespleißt, allerdings verschlechtert sich die Spleißeffizienz nach Inhibition der Kinase (+Inh.) (*trs402*^{-1Mut1U.N} + *trs402*^{-1Mut1A.N}) oder das Intron wird nicht mehr, auch ohne Inhibition der Kinase, erkannt (*trs402*^{-1Mut1C.N} + *trs402*^{-1Mut1G.N}). M, Größenstandard; H₂O, Kontrollreaktion ohne RNA als Template; Rechts: schematische Darstellung von prä-mRNA sowie mRNA und die gesetzten Mutationen. Mutierte Basen sind dick gedruckt, rot und mit kleinen Buchstaben hervorgehoben. Die Positionen sind angegeben. Links: Größenangaben des Standards und schematische Darstellung der Basenpaarung der U1 snRNA und Exon1/5'-SS; Ψ, Pseudouridin; |, Watson-Crick Basenpaarung; +, G-U Basenpaarung; φ, A-Ψ Paarung; *, markiert die Position des zu erwartenden prä-mRNA bzw. mRNA Fragments.

Bei der RT-PCR des Allels *trs402*^{-1Mut1C.N} wird zu allen Zeitpunkten fast ausschließlich prä-mRNA amplifiziert. Vor Inhibition und 10 Min. und 180 Min. nach Inhibition der Kinase ist eine schwache mRNA Bande zu sehen. Dies bedeutet, dass auch vor Inhibition der Kinase das Intron sehr ineffizient gespleißt wird. Bei dem Allel *trs402*^{-1Mut1G.N} wird vor und nach Inhibition der Kinase ausschließlich prä-mRNA detektiert, was darauf hinweist, dass das

Intron nicht mehr erkannt und gespleißt wird. Anders sieht es bei den Allelen *trs402*^{-1Mut1U.N} und *trs402*^{-1Mut1A.N} aus. Vor Inhibition der Kinase ist im Vergleich zu dem Allel *trs402*^{-1.N} eine eindeutige Verbesserung der Spleißeffizienz zu beobachten. Nach Inhibition der Kinase akkumuliert von 30 Min. bis 90 Min. prä-mRNA. Dabei liegt in etwa genauso viel prä-mRNA wie mRNA vor. Somit akkumuliert weder prä-mRNA eindeutig noch verschwindet die mRNA. Das bedeutet, dass die Spleißeffizienz verschlechtert wird, aber das Intron der beiden Allele nicht unbedingt Prp4-abhängig, aber auch nicht eindeutig Prp4-unabhängig gespleißt wird (Abbildung 43 B).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das Prp4-unabhängig gespleißte Allel *trs402*^{-WT.N} genau wie *res1*^{-1.K} nicht durch Mutationen oberhalb der AGG/5'-SS beeinflusst wird. Mutationen in Gs in dieser Region resultieren bei beiden Reportertranskripten in einer leichten Verschlechterung der Spleißeffizienz des Introns (Abbildung 30, S. 58 + Abbildung 41, S. 71). Wird ein Intron Prp4-unabhängig gespleißt und es liegt somit eine starke X₃X₂X₁/5'-SS vor, haben Mutationen oberhalb dieser weder einen Einfluss auf die Intronerkennung noch auf die Prp4-Abhängigkeit.

Liegt jedoch eine schwache X₃X₂X₁/5'-SS vor und das Intron wird Prp4-abhängig gespleißt, haben Mutationen oberhalb dieser Region sowohl eine Auswirkung auf die Erkennung als auch auf die Prp4-Abhängigkeit des Introns. Die Mutationen können trotz einer schwachen X₃X₂X₁/5'-SS dazu führen, dass das Intron Prp4-unabhängig gespleißt wird. Die Ergebnisse zeigen sehr deutlich, dass dabei der Gen-Kontext, in dem sich das Intron befindet, eine wesentliche Rolle spielt.

III Diskussion

Die Aktivität der essentiellen Prp4 Kinase aus *S. pombe* wird benötigt, um Introns mit schwachen Spleißstellen zu erkennen und effizient heraus zu spleißen (Eckert et al., 2016; Andrée-Busch et al., 2018). Wie die Intronerkennung genau erfolgt und welche Proteine als Substrate der Kinase daran beteiligt sind, ist bis heute unbekannt. Mit Hilfe der RIP wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Intronerkennung in *S. pombe* zuerst durch Anlagerung des U1 snRNP am 5'-Ende des Introns erfolgt. Die Funktion der Prp4 Kinase sollte bei diesem essentiellen Schritt der Intronerkennung weiter aufgeklärt werden. Dafür wurde die analog-sensitive Prp4 Kinase (Prp4_{as2}), die chemisch durch einen ATP-analogen Inhibitor gehemmt werden kann, verwendet. Es wurde gezeigt, dass die Aktivität der Prp4 Kinase mit den SR Proteinen, Srp1 und Srp2, in Verbindung steht. Fehlen diese beiden Proteine in der Zelle, werden nahezu alle Introns Prp4 Kinase-unabhängig gespleißt. Außerdem wurde gezeigt, dass die beiden nicht-essentiellen Kinasen, Dsk1 und Lkh1, auch an diesem Mechanismus beteiligt sind. Eine Deletion dieser beiden Kinasen führt ebenfalls zu Prp4-Unabhängigkeit der Introns. Mutationsanalysen im 5'-Exon oberhalb der X₃X₂X₁/5'-SS zweier Reportergene, die Prp4-abhängig gespleißte Introns besitzen, zeigen eindeutig, dass auch die Sequenz im Bereich des 5'-Exons sowohl einen Einfluss auf die Erkennung als auch auf die Prp4 Kinase-Abhängigkeit der Introns hat. Introns mit starken SSs und BSs, die unabhängig von der Aktivität der Prp4 Kinase gespleißt werden, sind von Mutationen im Bereich des 5'-Exons nicht beeinflusst. Bei Prp4-abhängigen Introns könnten die SR Proteine während der Intronerkennung an Bereiche im 5'-Exon binden und durch Interaktion mit Proteinen des U1 snRNPs die Interaktion zwischen prä-mRNA und U1 snRNA stabilisieren. So könnte das effiziente Herausspleißen des Introns sichergestellt und durch die Aktivität der Prp4 Kinase reguliert werden. Bei Prp4-unabhängigen Introns wird diese Stabilisierung durch die SR Proteine vermutlich nicht benötigt, da die Interaktion zwischen der starken X₃X₂X₁/5'-SS und der U1 snRNA ausreichend ist, damit das Intron erkannt und gespleißt wird. Die Prp4 Kinase scheint zusammen mit den SR Proteine und den beiden nicht-essentiellen Kinasen, Dsk1 und Lkh1, Teil eines Mechanismus zu sein, der in *S. pombe* das Herausspleißen von Introns mit schwachen 5'-Exon/5'-SSs und BSs/3'-SSs sicherstellt und koordiniert.

1 Evolution der spleißosomalen Introns

Zunächst stellen sich folgende Fragen: Wie sind spleißosomale Introns entstanden und wie werden sie erkannt? Und warum besitzt *S. pombe* schwache 5'-Exon/5'-SSs und BSs/3'-SSs? Bereits 1978 wurde entdeckt, dass Gene durch Introns unterbrochen sind (Gilbert, 1978). Im Laufe der Jahre entwickelten sich zwei verschiedene Hypothesen

bezüglich ihrer Entstehung. Zum einen die *introns-early* und zum anderen die *introns-late* Hypothese. Die *introns-early* Hypothese geht davon aus, dass alle Introns sehr früh in der Evolution entstanden sind und sowohl Eukaryoten als auch Archaeen und Prokaryoten Introns besaßen. Die Archaeen und Prokaryoten, die heute entweder keine Introns oder nur wenige nicht-spleißosomale Introns besitzen, sollen sowohl die spleißosomalen Introns als auch die Komponenten des Spleißosoms im Lauf der Evolution verloren haben (Gilbert, 1987; Penny et al., 2009). Bei der *introns-late* Hypothese wird davon ausgegangen, dass Introns zu verschiedenen Zeitpunkten der Evolution entstanden sind und ausschließlich Eukaryoten diese besitzen (Cavalier-Smith, 1985, 1987; Logsdon et al., 1995). Letztendlich entwickelte sich aus diesen beiden Hypothesen die aktuelle Hypothese, die als *many introns early in eukaryotic evolution* bezeichnet wird. Diese vereint die beiden zuvor beschriebenen Hypothesen (Rogozin et al., 2012). Spleißosomale Introns sollen von den selbst-spleißenden Gruppe-II-Introns abstammen, die während der Entstehung der Eukaryoten in die Gene gelangt sind. Dabei könnten die selbst-spleißenden Gruppe-II-Introns beim Eintritt des mitochondrialen Endosymbionten (α -Proteobakteria) gleichzeitig oder kurz nach der Entstehung der eukaryotischen Zelle, in die Wirts-Gene der Archaeen übertragen worden sein. Diese sind dort verblieben und haben sich vermehrt. Der eukaryotische Vorfahre hatte letztlich vermutlich ein intronreiches Genom mit schwachen SSs und die Spleißreaktion war dadurch sehr fehleranfällig. Die Evolution der Eukaryoten führte daraufhin in zwei verschiedene Richtungen der Entwicklung. Einerseits fand vermutlich irgendwann ein massiver Verlust von Introns mit gleichzeitiger Konservierung der SSs statt, was zu den heutigen intronarmen Organismen führte. Andererseits wurde das Genom komplexer und es reicherten sich Komponenten an, die das Erkennen der schwachen SSs ermöglichten und sicherstellten, was zu den heutigen intronreichen Organismen und bei einigen dieser letztendlich zur Entstehung des regulierten alternativen Spleißens führte (Koonin, 2009; Rogozin et al., 2012; Irimia und Roy, 2014; Ku et al., 2015). Zusammengefasst hat bei den heutigen intronarmen Organismen ($< 0,2$ Introns/Gen), zu denen beispielsweise *S. cerevisiae* zählt, ein massiver Verlust von Introns stattgefunden. Die wenigen verbliebenen Introns bei diesen Organismen weisen stark konservierte SSs und BSs auf, die eine hohe Komplementarität zur U1 und U2 snRNA zeigen. Die meisten Organismen sind allerdings intronreich, zu denen auch *S. pombe* und *H. sapiens* zählen, und besitzen schwache, wenig konservierte SSs und BSs, die häufig nicht 100 % komplementär zu den Regionen in der U1 und U2 snRNA sind (Abbildung 4, S. 8). Somit korreliert die Anzahl der Introns mit der Konservierung der SSs und BSs. Heute wird wie zuvor beschrieben davon ausgegangen, dass schon der eukaryotische Vorfahre intronreich war und schwache SSs besaß (Rogozin et al., 2003; Irimia et al., 2007; Irimia und Roy, 2008; Rogozin et al., 2012).

Obwohl *S. pombe* genau wie *H. sapiens* zu den intronreichen Organismen gehört und 44,6 % der Gene Introns enthalten hat sich gezeigt, dass es Unterschiede in Bezug auf die Exon-Intron Architektur zwischen den Organismen gibt. *S. pombe* besitzt im Vergleich zu Mammalia eher kleine Introns, mit einer durchschnittlichen Größe von 83 bp (Wood et al., 2002; Kupfer et al., 2004; Schwartz et al., 2008; Wood et al., 2012). Generell ist die Exon-Intron Architektur zwischen Pilzen und Mammalia sehr unterschiedlich. Die durchschnittliche Größe von Introns liegt in Pilzen bei ca. 100 bp und in Mammalia bei ca. 1500 bp. Die durchschnittliche Länge der Exons scheint in Mammalia etwas kürzer als in Pilzen zu sein (Schwartz et al., 2008). Hat dies einen Einfluss auf die Intronerkennung? Es wird davon ausgegangen, dass es zwei Möglichkeiten gibt wie ein Intron erkannt werden kann. Die Erkennung kann entweder nach dem Intron-Definitions-Modell oder nach dem Exon-Definitions-Modell erfolgen. Bei dem Intron-Definitions-Modell wird das Intron definiert und anschließend gespleißt. Demnach wird zuerst die 5'-Exon/5'-SS durch den U1 snRNP erkannt und das 3'-Ende durch Erkennungsproteine markiert. Anschließend assembliert sich das Spleißosom über das Intron hinweg und das Intron wird herausgespleißt (Collins und Penny, 2006; Ram und Ast, 2007). Im Gegensatz dazu werden bei der Erkennung des Introns durch das Exon-Definitions-Modell zuerst die Exon-Intron-Übergänge, sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende des Introns, durch Spleißfaktoren markiert. Es folgt eine Interaktion zwischen diesen Faktoren über das Exon hinweg und das Exon wird somit definiert. Anschließend ist eine Umstrukturierung erforderlich, um die Interaktion über das Exon hinweg aufzulösen und die Assemblierung des Prä-Spleißosoms auf dem oberhalb gelegenen Intron zu ermöglichen. Dies führt schließlich zur Spleißreaktion (Robberson et al., 1990; Berget, 1995; Schneider et al., 2010a; Braunschweig et al., 2013; De Conti et al., 2013). Es wird davon ausgegangen, dass bei langen Exons, die durch kurze Introns (< 250 bp) unterbrochen werden, die Erkennung nach dem Intron-Definitions-Modell erfolgt. Sind kurze Exons durch lange Introns (> 250 bp) unterbrochen, erfolgt die Erkennung nach dem Exon-Definitions-Modell. In Mammalia erfolgt die Erkennung der Introns vermutlich sowohl nach dem Intron- als auch nach dem Exon-Definitions-Modell. In Pilzen hingegen, in denen lange Exons durch kurze Introns unterbrochen sind, erfolgt die Erkennung höchstwahrscheinlich nach dem Intron-Definitions-Modell (De Conti et al., 2013; Andrée et al., 2016). Wie bereits erwähnt sind die SSs und BSs in intronreichen Organismen, wie *S. pombe* und *H. sapiens*, häufig nicht konserviert, wodurch die Erkennung des Introns erschwert wird (Schwartz et al., 2008). Die Zelle besitzt deshalb Mechanismen, die die Bindung der snRNAs an die prä-mRNA unterstützen und stabilisieren, wobei die SR Proteine eine entscheidende Rolle spielen (Graveley, 2000). Außerdem wurde gezeigt, dass die Aktivität der Prp4 Kinase in *S. pombe* für das Spleißen dieser Introns essentiell ist (Eckert et al., 2016). In dem intronarmen Organismus *S. cerevisiae*, der hoch konservierte SSs und

BSs hat, konnten weder typischen SR Proteine noch eine Prp4 Kinase identifiziert werden (Käufer und Potashkin, 2000; Kuhn und Käufer, 2003; Andrée et al., 2016). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Prp4 Kinase und die SR Proteine in *S. pombe* zusammen Teil eines Mechanismus sind, der das Herausspleißen von Introns mit schwachen SSs und BSs sicherstellt.

2 Proteine, die im ersten Schritt der Intronerkennung *in vivo* in *S. pombe* involviert sind, konnten als *in vitro* Substrate der Prp4 Kinase identifiziert werden

Wie zuvor beschrieben, wird davon ausgegangen, dass Introns in *S. pombe*, sowie in anderen Pilzen, gemäß dem Intron-Definitions-Modell durch die Interaktion der spleißosomalen Subpartikel über das Intron hinweg erkannt werden (De Conti et al., 2013; Andrée et al., 2016). Dabei sind die SSs und BSs für die Intronerkennung essentiell. In dieser Arbeit wurde mit Hilfe der RIP gezeigt, dass die Intronerkennung in *S. pombe* im ersten Schritt wahrscheinlich durch Anlagerung des U1 snRNPs erfolgt. Bei allen drei untersuchten Introns der Gene *dbp2*, *srp54* und *prs5* wurden von den untersuchten U1 snRNP Proteinen mehr im 5'-Exon/5'-SS als im BS/3'-SS Bereich nachgewiesen. Außerdem wurde bei den Introns der Gene *dbp2* und *srp54* von den Proteinen Bpb1 und Uaf2 mehr im BS/3'-SS als im 5'-Exon/5'-SS Bereiche gefunden. Von den Proteinen des U2 snRNPs und des U5 snRNPs wurde in beiden Bereichen gleich viel nachgewiesen (Abbildung 10, S. 22). Dies lässt vermuten, dass als erstes der U1 snRNP den Intronanfang und die Proteine Bpb1, Prp2 und Uaf2 die BS und das Intronende erkennen und so der E-Komplex gebildet wird (Abbildung 7, S. 18). Anschließend gibt es zwei Möglichkeiten wie sich das Spleißosom weiter assembliert. Einerseits könnte es sein, dass sich das Spleißosom als vorgeformter Tetra-snRNP anlagert und das prä-katalytische Spleißosom (B-Komplex) bildet (Abbildung 7 B, S. 18). Es ist allerdings aus *S. pombe* bekannt, dass das SR-ähnliche Protein Rsd1 als Brückenprotein zwischen dem 5'-Exon/5'-SS und BS/3'-SS Bereich des Introns agiert. Dabei verbindet spRsd1 (hsRBM39/23) den U1 und U2 snRNP während der prä-Spleißosom Formation (A-Komplex). Dies findet statt, indem Rsd1 mit dem U1 snRNP Protein spU1A (hsU1A) und der Helikase spPrp11 (hsDDX46), die wiederum an den U2 snRNP bindet, interagiert (Shao et al., 2012). Die zweite Möglichkeit wäre folglich, dass sich der U2 snRNP, nach der Bildung des E-Komplexes, über das Brückenprotein Rsd1 an die BS anlagert und dadurch der A-Komplex (das prä-Spleißosom) gebildet wird. Anschließend lagern sich die spleißosomalen Subpartikel als Tri-snRNP an und das prä-katalytische Spleißosom (B-Komplex) wird gebildet (Abbildung 7 A, S. 18). Die Möglichkeit, dass das Spleißosom als vorgeformter Penta-snRNP das Intron erkennt und sich anlagert, kann durch die Ergebnisse der RIP ausgeschlossen werden (Abbildung 7 C, S. 18). Als

nächstes stellte sich die Frage welche Rolle die Prp4 Kinase im ersten Schritt der Intronerkennung bei Anlagerung des U1 snRNPs an die 5'-Exon/5'-SS und der Proteine Bpb1, Prp2 und Uaf2 an die BS/3'-SS spielt? Deswegen wurden Proteine des U1 snRNPs sowie Bpb1, Prp2 und Uaf2 in *in vitro* Kinase Assays als potentielle Substrate der Kinase untersucht. Das Intron-Definitions-Modell schließt nicht aus, dass auch Proteine, die nicht direkt mit dem Spleißosom assoziiert sind, wie beispielsweise die SR und SR-ähnlichen Proteine, eine wichtige Rolle während der Intronerkennung spielen. Deswegen wurden, neben den zuvor erwähnten Proteinen, auch die SR Proteine, Srp1 und Srp2, und das SR-ähnliche Protein Rsd1 in den Kinase Assays eingesetzt.

Mit Hilfe der Kinase Assays wurden neue *in vitro* Substrate der Prp4 Kinase ermittelt (U1-70K, Bpb1, Srp2, Rsd1). Außerdem wurde gezeigt, dass alle *in vitro* Substrate der Prp4 Kinase auch durch Dsk1 und Lkh1 Kinase *in vitro* phosphoryliert werden. Diese beiden Kinasen phosphorylieren auch weitere Substrate (U1A, Srp1, U1H, Prp2). Werden die bevorzugten Substrat-Sequenzen berücksichtigt und mit den durch Phosphoproteom-Analysen identifizierten Phosphorylierungsstellen verglichen, haben alle untersuchten Proteine potentielle Phosphorylierungsstellen der drei Kinasen. Alle drei Kinasen zeigen unterschiedliche Substrat-Sequenzen. Die beiden Kinasen Dsk1 und Lkh1 haben die Konsensussequenz RXX[S/T]P. Diese beiden Kinasen bevorzugen ein Arginin an Position -3 und ein Prolin an Position +1. Prp4 Kinase hingegen zeigt als Konsensussequenz GXX[S/T]P und bevorzugt folglich ein Glycin an Position -3 und ein Prolin an Position +1. Teile dieser Konsensussequenzen können bei allen identifizierten *in vitro* Substraten gefunden werden (Tabelle 3).

Das U1 snRNP Protein U1-70K wurde in diesen Kinase Assays als *in vitro* Substrat der drei Kinasen Prp4, Dsk1 und Lkh1 identifiziert. Durch Phosphoproteom-Untersuchungen wurden bei diesem Protein zwei Phosphorylierungsstellen gefunden (Swaffer et al., 2018). Eine dieser ist S253 mit der Sequenz GXXS und ist somit eine potentielle Phosphorylierungsstelle der Prp4 Kinase. Auch bei den anderen *in vitro* Substraten der Prp4 Kinase wurde mindestens eine potentielle Phosphorylierungsstelle der Prp4 Kinase anhand der ermittelten Konsensussequenz identifiziert. Bei Bpb1 ist es S400 mit der Sequenz GXXSP, bei Rsd1 sind es T74 mit GXXTP und S130 mit GXXSP und bei Srp2 ist es S283 mit GXXS. In Bezug auf die identifizierten *in vitro* Substrate der beiden Kinasen Dsk1 und Lkh1 sind ebenfalls in allen Proteinen Teile der Konsensussequenz RXXSP zu finden. Zusammengefasst konnten in allen Proteinen potentielle Serine/Threonine ermittelt werden, die *in vivo* phosphoryliert werden könnten (Tabelle 3, S. 81). Das heißt nicht, dass es nicht auch noch weitere Serine/Threonine gibt, die in diesen Proteinen phosphoryliert werden. *In vivo* ist es auch möglich, dass die Kinasen Substrate phosphorylieren, die nicht die bevorzugte Substrat-Sequenz zeigen. Die *in silico* identifizierten potentiellen Phosphorylierungsstellen geben

ausschließlich erste Hinweise darauf, an welchen Positionen das Protein durch die Kinasen *in vivo* phosphoryliert werden könnte.

Tabelle 3| *In vitro* Substrate der Kinasen Prp4, Dsk1 und Lkh1 mit den potentiellen Phosphorylierungsstellen und der entsprechenden Aminosäuresequenz

Potentielle Phosphorylierungsstellen der Prp4 Kinase sind fett gedruckt. *In vitro* Substrate der drei Kinasen Prp4, Dsk1 und Lkh1 in schwarz, nur von Dsk1 und/oder Lkh1 Kinase in grau.

Protein	Phosphorylierungsstellen	Referenz der annotierten Phosphorylierungsstellen	In vitro Substrat von		
			Prp4	Dsk1	Lkh1
spU1-70K (hsU1-70K)	S253 (GXXS) , S254 (RXXSP)	(Swaffer et al., 2018)	x	x	x
spBpb1 (hsSF1)	S131 (RXXSP), S133 (RXXSP), S400 (GXXSP)	(Wilson-Grady et al., 2008; Kettenbach et al., 2015; Swaffer et al., 2018)	x	x	x
spRsd1 (hsRBM39/23)	T74 (GXXTP) , S130 (GXXSP) , S132 (RXXSP); noch weitere SP bzw. TP, aber ohne die anderen Aminosäurereste drum herum und nicht als Phosphorylierungsstelle annotiert	(Wilson-Grady et al., 2008; Kettenbach et al., 2015; Swaffer et al., 2018)	x	x	x
spSrp2 (hsSRSF4/5/6)	S186 (RXXS), S188 (RXXSP), S283 (GXXS) , S296 (SP), S298 (RXXSP), S308 (SP)	(Kettenbach et al., 2015; Swaffer et al., 2018)	x	x	x
spU1A (hsU1A)	S15 (SP)	(Carpy et al., 2014; Swaffer et al., 2018)	-	-	x
spPrp2 (hsU2AF2)	S8 (RXXS), S94 (RXXS), S100 (RXXSP); für Prp4 Kinase potentielle Phosphorylierungsstellen T254 (TP), S266 (GXXS), nicht als Phosphorylierungsstellen annotiert	(Kettenbach et al., 2015)	(x?)	x	x
spU1H (hsRBM25)	S572 (SP)	(Swaffer et al., 2018)	-	x	x
spSrp1 (hsSRSF2)	S115 (RXXS), S117 (RXXSP), S119 (RXXSP), S127 (RXXSP), S156 (RXXSP), S163 (SP), S170 (SP), S172 (RXXSP), S181 (SP)	(Wilson-Grady et al., 2008; Carpy et al., 2014; Kettenbach et al., 2015; Swaffer et al., 2018)	-	x	x

Aufgrund dieser Analysen wird davon ausgegangen, dass die drei Kinasen Prp4, Dsk1 und Lkh1 verschiedene Proteine während der Intronerkennung phosphorylieren. Die Ergebnisse zeigen, dass die Prp4 Kinase *in vitro* Proteine phosphoryliert, die an der Erkennung der

5'-Exon/5'-SS und BS/3'-SS beteiligt sind, sowie das SR Protein Srp2 und das SR-ähnliche Protein Rsd1. Im Fall einer schwachen 5'-Exon/5'-SS könnte die Phosphorylierung von Srp2 durch die Prp4 Kinase dazu führen, dass die 5'-Exon/5'-SS für die korrekte komplementäre Basenpaarung mit der U1 snRNA präsentiert und die Basenpaarung nachfolgend stabilisiert wird. Die Stabilisierung könnte durch die Protein-Protein-Interaktion von Srp2 mit U1-70K des U1 snRNPs erfolgen. Die Prp4 Kinase phosphoryliert U1-70K, sodass dadurch die Protein-Protein-Interaktion mit Srp2 ermöglicht werden könnte. Aus Mammalia ist bekannt, dass das SR Protein hsSRSF1 an die prä-mRNA bindet und durch Phosphorylierung der RS-Domäne, durch die hsSRPK (spDsk1) und/oder hsCLK (spLkh1) Kinasen, die Protein-Protein-Interaktion mit dem Protein hsU1-70K (spU1-70K) des U1 snRNPs ermöglicht wird (Cho et al., 2011).

In Bezug auf die 3'-SS ist aus *S. pombe* bekannt, dass Srp2 mit Uaf2 interagiert und so vermutlich die Bindung von Uaf2 an die 3'-SS stabilisiert wird (Webb und Wise, 2004). Dieses Protein wurde im *in vitro* Kinase Assay nicht als Substrat der Prp4 Kinase identifiziert. Die BS wird im ersten Schritt durch das Protein Bpb1 erkannt. Anschließend muss Bpb1 von der BS abgelöst werden, damit sich der U2 snRNP mit der U2 snRNA über komplementäre Basenpaarung an die BS anlagern kann. Bpb1 wird *in vitro* durch die Prp4 Kinase phosphoryliert. Es wäre denkbar, dass die Phosphorylierung von Bpb1 zu einer Konformationsänderung des Proteins und folglich zu einer Strukturänderung der prä-mRNA führt, die die Ausbildung der komplementären Basenpaarung zwischen BS und snRNA U2 ermöglicht. Dies könnte zeitgleich mit der Phosphorylierung von Rsd1 durch die Prp4 Kinase erfolgen, was die stabile Anordnung des prä-Spleißosoms (A-Komplex) unterstützen könnte (Shao et al., 2012). Zeitgleich könnte dies signalisieren, dass sich der U1 und U2 snRNP an den richtigen SSs und BSs auf der prä-mRNA befinden und die transienten komplementären Basenpaarungen zwischen der 5'-SS und U1 snRNA und der BS und U2 snRNA geformt wurden. Dann wird der B-Komplex aufgebaut und das Spleißosom wird aktiviert, sodass die Transester-Reaktionen ablaufen können. Basierend auf den bisherigen Ergebnissen könnte die Aktivität der Prp4 Kinase an mehreren Schritten während der Assemblierung des Spleißosoms erforderlich sein, um zu signalisieren, dass die beteiligten Komponenten richtig an das Intron angelagert sind (Andrée-Busch et al., 2018). Da der erste Schritt während der Assemblierung des Spleißosoms die Erkennung der 5'-Exon/5'-SS ist, spielt die Sequenz dieser eine entscheidende Rolle, ob die Aktivität der Prp4 Kinase benötigt wird oder nicht (Eckert et al., 2016). Hat aber auch die Sequenz im Bereich der Exons einen Einfluss auf die Erkennung und Prp4 Kinase-Abhängigkeit des Introns? Dies wurde im nächsten Schritt überprüft, indem die Auswirkungen von Mutationen im 5'-Exon oberhalb der X₃X₂X₁/5'-SS auf die Erkennung und Prp4-Abhängigkeit des Introns untersucht wurden.

3 Bei Introns mit schwachen $X_3X_2X_{-1}/5'$ -SSs hat die Sequenz im 5'-Exon einen Einfluss auf die Erkennung und Prp4 Kinase-Abhängigkeit des Introns

Das prä-mRNA Spleißen ist ein wichtiger Teil der eukaryotischen Genexpression (Braunschweig et al., 2013). Die SSs und BSs sind dabei für die Erkennung und das effiziente Herausspleißen des Introns entscheidend (Eckert et al., 2016; Andrée-Busch et al., 2018; Wong et al., 2018). Wie zuvor beschrieben sind diese allerdings in intronreichen Organismen, wie *S. pombe* und *H. sapiens*, häufig nicht konserviert, wodurch die Erkennung des Introns erschwert wird. Deswegen werden zusätzliche Mechanismen benötigt, damit das Intron erkannt und effizient gespleißt wird. Aus Mammalia ist bekannt, dass SR Proteine dazu beitragen, die spleißosomalen Komponenten zu den richtigen 5'- und 3'-SSs zu rekrutieren. Dabei binden sie über ihre RRM s an *cis*-regulatorische Elemente und interagieren während der Intronerkennung als *trans*-agierende Spleißfaktoren mit Komponenten des Spleißosoms. In Mammalia befinden sich diese *cis*-regulatorischen Elemente in Exons und Introns. Diese werden als *splicing regulatory elements* (SREs) bezeichnet. Eine Gruppe der SREs bilden dabei die *Exonic Splicing Enhancer* (ESE). ESE-Sequenzen sind oft in Exons von konstitutiv gespleißten Introns zu finden, um das effiziente Herausspleißen des Introns mit Hilfe von SR Proteinen sicherzustellen (Graveley, 2000; Wang und Burge, 2008). Auch die Sekundärstruktur der RNA spielt eine wichtige Rolle während der Intronerkennung. Grundsätzlich ist die prä-mRNA *in vivo* größtenteils mit RNA-bindenden Proteinen beschichtet, wodurch die Faltung der Sekundärstruktur beeinflusst wird. Die RNA weist aber auch Bereiche auf, an denen keine Proteine gebunden sind. Infolgedessen liegen ausgewählte Bereiche vor, in denen Sekundärstrukturen unabhängig von diesen Proteinen ausgebildet werden können (Buratti und Baralle, 2004). Durch die Sekundärstruktur der RNA kann die Erkennung der SSs und BSs behindert werden (Deshler und Rossi, 1991; Goguel et al., 1993; Varani et al., 1999; McManus und Graveley, 2011). Diese kann außerdem die Bindung der SR Proteine beeinflussen und umgekehrt (Buratti und Baralle, 2004; Warf und Berglund, 2010; McManus und Graveley, 2011).

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob in *S. pombe* nicht nur die SSs und BSs sondern auch die Sequenzen im Bereich der Exons oberhalb der 5'-Exon/5'-SS auf die Intronerkennung einwirken. Dabei könnten Mutationen sowohl die Sekundärstruktur der RNA als auch die Bindung der SR Proteine an die prä-mRNA verändern. Deswegen wurden die Auswirkungen von Mutationen im 5'-Exon oberhalb der $X_3X_2X_{-1}/5'$ -SS von sowohl Prp4 Kinase-abhängigen als auch -unabhängigen Reportergen en in Bezug auf die Erkennung und Prp4 Kinase-Abhängigkeit der Introns analysiert. Als erstes Reportergen wurde das Gen *res1* verwendet, das ein Prp4-abhängiges Intron hat (*res1*^{-WT.K}). Es wurde gezeigt, dass die Mutationen der Nukleotide im Bereich Mut1, von Position -4 bis -13, bei

diesem Allel den größten Einfluss auf die Erkennung und Prp4 Kinase-Abhängigkeit des Introns haben (Abbildung 26, S. 51 + Abbildung 27, S. 52). Die AAG/5'-SS wurde anschließend so verändert, dass das Intron Prp4-unabhängig (*res1'-1.K*, S. 56) gespleißt wird. Dadurch können die Folgen von Mutationen im Bereich des 5'-Exons eines ursprünglich Prp4-abhängigen Introns auch in einem künstlich erzeugten Prp4-unabhängigen Intron untersucht werden. Mutationen im Bereich Mut1 verursachen keine Veränderungen bei dem Prp4-unabhängig gespleißten Allel *res1'-1.K* (Abbildung 30, S. 58).

Als zweites Reportergen wurde das Gen *trs402* verwendet, das ein Prp4-unabhängiges Intron hat (*trs402'-WT.N*). Bei diesem Allel haben Mutationen im Bereich Mut1 keinen Einfluss auf die Intronerkennung (Abbildung 41, S. 71). Im zweiten Schritt wurde bei diesem Reportergen die AGG/5'-SS so verändert, dass das Intron Prp4-abhängig (*trs402'-1.N*, S. 73) gespleißt wird. So können hier die Auswirkungen von Mutationen im Bereich des 5'-Exons oberhalb der AGG/5'-SS eines ursprünglich Prp4-unabhängigen Introns auch in einem künstlich erzeugten Prp4-abhängigen Intron analysiert werden. Die Mutationen im Bereich Mut1 bei dem Allel *trs402'-1.N* beeinflussen sowohl die Erkennung als auch die Prp4 Kinase-Abhängigkeit des Introns (Abbildung 43, S. 74).

Im Vergleich zeigt sich, dass Mutationen im 5'-Exon der beiden Prp4-unabhängigen Allele (*res1'-1.K* + *trs402'-WT.N*) keine Folgen haben (Abbildung 30, S. 58 + Abbildung 41, S. 71). Daher kann davon ausgegangen werden, dass primär eine starke $X_3X_2X_{-1}/5'$ -SS entscheidend ist, ob ein Intron erkannt und unabhängig von der Aktivität der Prp4 Kinase gespleißt wird. Liegt allerdings eine schwache $X_3X_2X_{-1}/5'$ -SS vor, und das Intron wird Prp4-abhängig gespleißt, ist sowohl die Erkennung als auch die Prp4-Abhängigkeit des Introns von Mutationen im 5'-Exon beeinflusst. Die beiden untersuchten Prp4-abhängigen Reportertranskripte verhalten sich in Abhängigkeit der ausgetauschten Nukleotide unterschiedlich (Abbildung 27, S. 52 + Abbildung 43, S. 74). Mutationen bei dem Prp4-abhängig gespleißten Allel *res1'-WT.K* haben entweder keine Konsequenzen (Mutationen in Cytidin- oder Uridin-Nukleotide) oder führen dazu, dass das Intron Prp4-unabhängig gespleißt (Mutationen in Adenosin-Nukleotide) oder nicht mehr erkannt wird (Mutationen in Guanotin-Nukleotide). Bei dem Prp4-abhängig gespleißten Allel *trs402'-1.N* führen Mutationen hingegen entweder dazu, dass das Intron nicht mehr erkannt (Mutationen in Cytidin- und Guanotin-Nukleotide) oder nahezu Prp4-unabhängig gespleißt wird und die Spleißeffizienz vor Inhibition der Prp4 Kinase sogar verbessert ist (Mutationen in Uridin- und Adenosin-Nukleotide).

Es war zuvor bekannt, dass die Prp4-Abhängigkeit intronspezifisch und nicht genspezifisch ist. In einem Gen können alle Introns Prp4-abhängig oder -unabhängig gespleißt werden, aber es existieren auch Gene, die beide Intronklassen enthalten. Dadurch ist die Sequenz der SSs und BSs des Introns entscheidend, ob das Intron Prp4-abhängig oder -unabhängig

gespleißt wird (Eckert et al., 2016). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass neben der Sequenz der SSs und BSs auch der angrenzende Kontext, in dem sich das Intron befindet, auf die Erkennung und Prp4 Kinase-Abhängigkeit von Prp4-abhängigen Introns einwirkt.

Dies wird auch deutlich, wenn die Ergebnisse der Punktmutationen im 5'-Exon des Prp4-abhängigen Allels *res1'-WT.K* betrachtet werden. Bei diesem Allel wurde gezeigt, dass insbesondere Position -4, abhängig davon welches Nukleotid sich an dieser Position befindet, die Prp4-Abhängigkeit des Introns stark verändert (Abbildung 36, S. 66+ Abbildung 37, S. 67). Ist diese Position in ein Adenosin mutiert, wird das Intron Prp4-unabhängig gespleißt. Liegt ein Uridin vor, ist die Spleißeffizienz nach Inhibition von Prp4 Kinase verschlechtert. Bei einem Cytidin oder Guanosin wird das Intron Prp4-abhängig gespleißt (Abbildung 37, S. 67). Dabei sind die Stärke der Akkumulation von prä-mRNA und das Verschwinden der mRNA mit dem Wildtyp-Allel *res1'-WT.K* (Position -4: Cytidin) vergleichbar. Interessanterweise haben Mutationen an dieser Position einen anderen Einfluss auf die Stärke der Akkumulation von prä-mRNA und auf das Verschwinden von mRNA, wenn die restlichen Positionen nicht der Wildtyp-Sequenz entsprechen. Wenn an Position -4 ein Cytidin vorliegt, wie in der Wildtyp-Sequenz, aber andere Positionen zusätzlich mutiert sind, ist die Akkumulation von prä-mRNA verringert (Vergleich: *res1'-WT.K*, S. 67 + *res1'-Mut1.11.K*, S. 66). Andererseits können aber zusätzliche Mutationen zu stärkerer und längerer Akkumulation von prä-mRNA und zu einem vollständigen Verschwinden der mRNA führen. Dies wird deutlich, wenn Position -4 in ein Guanosin mutiert ist und noch weitere Mutationen im Vergleich zur restlichen Wildtyp-Sequenz vorliegen (Vergleich: *res1'-Mut1.12.K*, S. 66 + *res1'-Mut1.15.K*, S. 67). Das zeigt eindeutig, dass die gesamte Sequenz in dem Bereich Mut1 und somit jede einzelne Position auf die Prp4-Abhängigkeit des Introns einwirken kann.

Auch in Mammalia wurde gezeigt, dass verschiedene Gen-Kontexte die Spleißeffizienz von Introns verändern können. Dabei wurde das Spleißverhalten von Introns mit verschiedenen 5'-SSs in jeweils drei unterschiedlichen Gen-Kontexten analysiert. Das Spleißverhalten der Introns wurde dabei durch die Stärke der 3'-SSs sowie von SREs (*Enhancer*- und *Silencer*-Sequenzen) beeinflusst (Wong et al., 2018). Es wurde auch gezeigt, dass nicht nur SREs sondern fast jedes einzelne Nukleotid eines 5'-Exons eine Veränderung des Spleißverhaltens verursachen kann. Ein Austausch eines einzigen Nukleotids in ein anderes kann bereits die Spleißeffizienz des Introns, sowohl positiv als auch negativ, verändern (Julien et al., 2016). Warum kann jedes einzelne Nukleotid eine Auswirkung auf die Spleißeffizienz des Introns haben? Zum einen kann schon der Austausch eines Nukleotids in ein anderes für die Rekrutierung von *trans*-agierende Spleißfaktoren verantwortlich sein, indem dadurch eine spezifische ESE-Sequenz erzeugt wurde. Zum anderen kann ein Nukleotidaustausch aber auch die Sekundärstruktur der prä-mRNA beeinflussen. Genau

genommen können diese beiden Prozesse nicht voneinander getrennt werden. In Mammalia gibt es spezifische ESE-Sequenzen, an die SR Proteine als *trans*-agierende Spleißfaktoren binden und so auf das Herausspleißen des Introns einwirken. Allerdings kann nicht nur die Sequenz sondern auch die Sekundärstruktur der prä-mRNA eine Auswirkung auf die Bindung der SR Proteine an die prä-mRNA haben (Muro et al., 1999; Buratti et al., 2004). Umgekehrt kann aber auch die Bindung von Proteinen an die RNA zu einer spezifischen Faltung und folglich einer Sekundärstruktur der restlichen RNA führen (Kent et al., 2003). Durch diese Mechanismen wird in Mammalia das Herausspleißen von Introns beeinflusst und infolgedessen die Genexpression reguliert (Shepard und Hertel, 2008). In Pilzen wurde außerdem gezeigt, dass die prä-mRNA an den Exon-Intron-Übergängen häufig nur schwach gefaltet ist. Dadurch sind die SSs besser zugänglich, welches wiederum die Spleißeffizienz der Introns verändern kann (Zafrir und Tuller, 2015).

Zusammengefasst sind die Sekundärstruktur der RNA sowie die Bindung von SR Proteinen an die prä-mRNA als *trans*-agierende Spleißfaktoren wichtige Parameter, ob und wie effizient ein Intron gespleißt wird (Buratti und Baralle, 2004; Warf und Berglund, 2010; Zafrir und Tuller, 2015). Dabei kann jedes einzelne Nukleotid und folglich der gesamte Kontext, in dem sich das Intron befindet, sowie die SSs und BSs einen Einfluss auf die Intronerkennung und Spleißeffizienz haben (Eckert et al., 2016; Julien et al., 2016; Andrée-Busch et al., 2018; Wong et al., 2018). Es bleibt weiterhin zu klären, ob in *S. pombe* ESE-Sequenzen oder zumindest Sequenzen, an die SR Proteine bevorzugt binden, existieren.

4 Die SR Proteine, Srp1 und Srp2, könnten zusammen mit den Kinasen Dsk1 und Lkh1 an dem Prp4 Kinase-abhängigen Mechanismus während der Intronerkennung beteiligt sein

Wie im vorherigen Kapitel beschrieben hat in *S. pombe* die Sequenz im 5'-Exon eine Auswirkung auf die Erkennung und Prp4-Abhängigkeit von Introns mit schwachen $X_3X_2X_{-1}/5'$ -SSs. Prp4-unabhängig gespleißte Introns sind von Mutationen im 5'-Exon nicht beeinflusst. Ob und wie die SR Proteine in *S. pombe* an diese Bereiche binden und so auf die Intronerkennung einwirken, ist immer noch nicht bekannt. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das Fehlen der SR Proteine in der Zelle ebenfalls das Verhalten Prp4-abhängig gespleißter Introns verändert. Überraschenderweise führt dies dazu, dass nahezu alle Introns Prp4-unabhängig gespleißt werden (Stamm 1059, Abbildung 15, S. 33 + Abbildung 17, S. 38). Wie ist dies zu erklären? SR Proteine sind dafür bekannt an *cis*-regulatorische Elemente zu binden und während der Intronerkennung als *trans*-agierende Spleißfaktoren mit Komponenten des Spleißosoms zu interagieren, um deren Bindung an die prä-mRNA zu stabilisieren (Graveley, 2000). Auf den ersten Blick scheint es somit widersprüchlich, dass Spleißen beim Fehlen der SR Proteine zu allen Zeitpunkten stattfindet.

Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit wurde für Prp4-abhängig gespleißte Introns das hypothetische Modell in Abbildung 44 erstellt. Liegt eine schwache $X_3X_2X_1/5'$ -SS vor, dauert es vermutlich länger bis die U1 snRNA über komplementäre Basenpaarung die richtige $X_3X_2X_1/5'$ -SS besetzt. Infolgedessen lagern sich Srp2 Proteine an die prä-mRNA an. Ob spezifische Sequenzen, in Form von ESE-Sequenzen, existieren, an die das SR Protein bindet, bleibt zu klären. Die anschließende Phosphorylierung von Srp2 könnte eine Konformationsänderung des Proteins bewirken und dazu führen, dass die $X_3X_2X_1/5'$ -SS für die korrekte komplementäre Basenpaarung mit der U1 snRNA präsentiert wird. Nachdem sich die U1 snRNA an die $X_3X_2X_1/5'$ -SS angelagert hat, muss diese transiente Interaktion zwischen prä-mRNA und U1 snRNA stabilisiert werden. Die Stabilisierung könnte durch die Protein-Protein-Interaktion von Srp2 mit U1-70K des U1 snRNPs erfolgen. Sowohl Srp2 als auch U1-70K wurden in dieser Arbeit als *in vitro* Substrate der Prp4 Kinase identifiziert (Abbildung 11, S. 25 + Abbildung 12, S. 27). Die Prp4 Kinase könnte U1-70K und/oder Srp2 phosphorylieren, sodass dadurch die Protein-Protein-Interaktion ermöglicht wird. Zusammengefasst wird die $X_3X_2X_1/5'$ -SS durch Bindung und anschließender Phosphorylierung von Srp2 für den U1 snRNP zugänglich gemacht. Dann kann die U1 snRNA die komplementären Basenpaarung mit der $X_3X_2X_1/5'$ -SS eingehen. Diese transiente Interaktion könnte durch die Protein-Protein-Interaktion zwischen Srp2 und U1-70K stabilisiert und durch die Phosphorylierung der beiden Substrate durch die Prp4 Kinase koordiniert werden. Anschließend wird der E-Komplex gebildet und das Spleißosom kann sich weiter assemblieren (Abbildung 44, A). Dieses Modell wird durch Analysen in Mammalia unterstützt. Es ist bekannt, dass hsSRSF1 mit dem U1 Protein hsU1-70K (spU1-70K) interagiert und dadurch die Bindung des U1 snRNPs an die 5'-Exon/5'-SS stabilisiert (Kohtz et al., 1994; Xiao und Manley, 1997; Cao und Garcia-Blanco, 1998; Cho et al., 2011). Dabei wird sowohl die Interaktion zwischen prä-mRNA und SR Protein als auch die Protein-Protein-Interaktion durch Phosphorylierung der RS-Domäne reguliert. Das SR Protein hsSRSF1 bindet dabei an ESE-Sequenzen im Exon. Eine intermolekulare Protein-Protein-Interaktion mit hsU1-70K (spU1-70K) wird erst ermöglicht, wenn die RS-Domäne von hsSRSF1 phosphoryliert wird (Cho et al., 2011).

III Diskussion

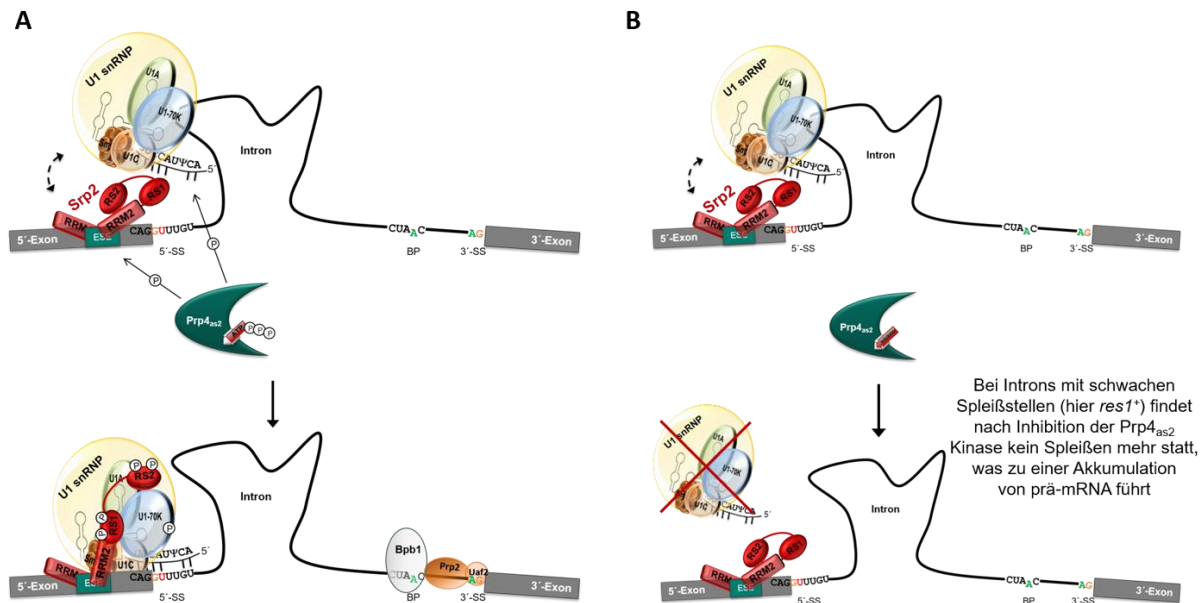


Abbildung 44| Hypothetisches Modell bei schwachen Spleißstellen - Prp4 Kinase phosphoryliert Srp2 und U1-70K und bewirkt so eine Interaktion zwischen den beiden Proteinen

(A) Srp2 bindet an die prä-mRNA. Ist die Prp4 Kinase aktiv, werden Srp2 und U1-70K phosphoryliert, was zu einer Konformationsänderung führt, sodass die beiden Proteine miteinander interagieren können. Folglich wird die Interaktion zwischen der prä-mRNA und dem U1 snRNP durch die Interaktion mit Srp2 stabilisiert. (B) Wird Prp4_{as2} Kinase inhibiert, findet keine Konformationsänderung statt, der U1 Partikel kann nicht an die prä-mRNA binden und Spleißen findet nicht statt. Dies führt dazu, dass in der RT-PCR prä-mRNA akkumuliert.

Wird die Prp4_{as2} Kinase inhibiert, werden Srp2 und U1-70K nicht phosphoryliert. Unter der Annahme, dass die Bindung von Srp2 an die prä-mRNA durch die Inhibition der Prp4_{as2} Kinase nicht beeinflusst wird, aber durch die fehlende Phosphorylierung keine Konformationsänderungen von Srp2 und U1-70K stattfinden können, wird die Anlagerung des U1 snRNPs an die X₃X₂X₁/5'-SS durch Srp2 blockiert. Das Intron wird infolgedessen nicht erkannt und nicht gespleißt (Abbildung 44, B). Dadurch, dass das Intron nicht erkannt und nicht herausgespleißt wird, ist in der RT-PCR das typische Spleiß-Inhibitionsmuster mit der Akkumulation von prä-mRNA und dem Verschwinden der mRNA zu beobachten (Stamm 801, Abbildung 15, S. 33).

Warum findet Spleißen statt, wenn die SR Proteine in der Zelle fehlen? Wenn Srp2 nicht in der Zelle vorhanden ist, liegt die X₃X₂X₁/5'-SS vermutlich frei zugänglich vor. Auch wenn im Fall einer schwachen X₃X₂X₁/5'-SS nicht alle komplementären Basenpaarungen zwischen der U1 snRNA und der prä-mRNA eingegangen werden können, könnte sich die U1 snRNA trotzdem anlagern. Diese Interaktion ist vermutlich weniger stabil aber ausreichend, damit das Intron erkannt und gespleißt wird. Das bedeutet aber nicht, dass in diesen Zellen effizienter gespleißt wird als in Zellen, in denen die SR Proteine vorliegen. Der Spleißprozess wird durch die Inhibition der Prp4_{as2} Kinase lediglich nicht mehr angehalten. Folglich ist die Akkumulation von prä-mRNA nach Inhibition der Prp4_{as2} Kinase nicht mehr zu beobachten und es wird effizient gespleißt (Stamm 1059, Abbildung 15, S. 33 + Abbildung 17, S. 38).

Somit scheinen die Prp4 Kinase und die SR Proteine das effiziente Spleißen von Introns mit schwachen $X_3X_2X_{-1}/5'$ -SSs sicherzustellen. Einerseits wird dadurch gewährleistet, dass die schwachen SSs erkannt und die Introns herausgespleißt werden. Andererseits stellt dies eine Kontrollebene der Genexpression dar, indem das Spleißen zeitlich durch die Phosphorylierung der Prp4 Kinase reguliert und koordiniert wird.

Aber nicht nur das Fehlen der SR Proteine führt von Prp4 Kinase-Abhängigkeit zu Prp4 Kinase-Unabhängigkeit. Das gleiche Ergebnis ist zu beobachten, wenn die beiden nicht-essentiellen Kinasen Dsk1 und Lkh1 gleichzeitig deletiert sind (Stamm 1176, Abbildung 20, S. 43). Wie ist dieses Ergebnis zu erklären?

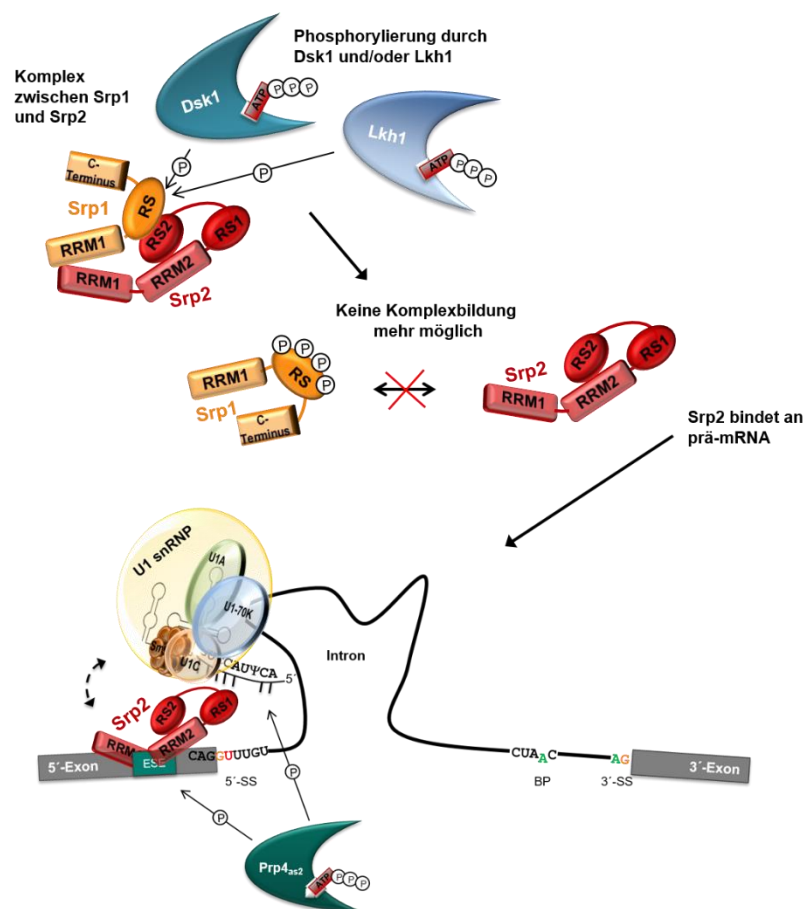


Abbildung 45| Hypothetisches Modell der Interaktion von Srp1 und Srp2 - Zusammenspiel der drei Kinasen Prp4, Dsk1 und Lkh1 und der SR Proteine Srp1 und Srp2

Die SR Proteine Srp1 und Srp2 liegen als Komplex in der Zelle vor. Die Phosphorylierung von Srp1 durch Dsk1 und/oder Lkh1 Kinase führt dazu, dass die beiden SR Protein keinen Komplex mehr bilden können. In diesem Zustand kann Srp2 an die prä-mRNA binden. Anschließend findet die Phosphorylierung durch Prp4 statt, um die Interaktion zwischen Srp2 und U1-70K zu ermöglichen.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung von Srp2 durch die Kinasen Dsk1 und Lkh1 nicht notwendig ist, damit das Protein im Kern lokalisiert (Abbildung 23, S. 47). Die Phosphorylierung der SR Proteine durch die Kinasen Dsk1 und Lkh1 könnte aber deren

Interaktion mit der prä-mRNA beeinflussen. Vermutlich können die SR Proteine nicht an die prä-mRNA binden, wenn die beiden Kinasen in der Zelle fehlen. Aus der Literatur ist bekannt, dass sowohl Dsk1 als auch Lkh1 Kinase die Interaktion der beiden SR Proteine, Srp1 und Srp2, durch Phosphorylierung beeinflussen. Dabei hemmt die Phosphorylierung die Interaktion zwischen den beiden SR Proteinen, insbesondere wenn Srp1 phosphoryliert vorliegt (Tang et al., 2002). Die beiden SR Proteine liegen vermutlich als Komplex im Zellkern vor. Die Phosphorylierung der SR Proteine im Komplex durch Dsk1 und/oder Lkh1 Kinase könnte dazu führen, dass der Komplex aufgelöst wird. Anschließend kann Srp2 an die prä-mRNA binden (Abbildung 45, S. 89). Danach erfolgt der zuvor beschriebene Mechanismus der Phosphorylierung von Srp2 durch die Prp4 Kinase (Abbildung 44, S. 88).

Was könnte der Grund dafür sein, dass die SR Proteine nicht an die prä-mRNA binden können, wenn Dsk1 und Lkh1 deletiert sind? Fehlen die beiden Kinasen in der Zelle, könnte das dazu führen, dass die SR Proteine dauerhaft als Komplex vorliegen. In diesem Zustand können die SR Proteine vermutlich nicht an die prä-mRNA binden. Dies resultiert darin, dass die untersuchten, Prp4-abhängigen Introns Prp4-unabhängig gespleißt werden. Dementsprechend ist in der RT-PCR nach Inhibition der Prp4_{as2} Kinase keine Akkumulation von prä-mRNA zu beobachten. Dies ist vergleichbar mit dem Ergebnis der RT-PCR, wenn die SR Proteine in der Zelle fehlen (Abbildung 20, S.43 + Abbildung 15, S. 33).

Eine andere Möglichkeit ist, dass auch in *S. pombe* die SR Proteine in *Speckles* vorliegen. Aus Mammalia ist bekannt, dass die Lokalisation der SR Proteine innerhalb des Zellkerns durch Phosphorylierung beeinflusst wird. SR Proteine gelangen dadurch von *Speckles*, die im Zellkern als Speicherorte für bestimmte Spleißfaktoren fungieren, zu Stellen aktiver Transkription (Misteli et al., 1997; Misteli et al., 1998; Graveley, 2000; Ngo et al., 2005; Keshwani et al., 2015). Sollten in *S. pombe* ebenfalls *Speckles* existieren, was nicht bekannt ist, wäre die Phosphorylierung der SR Proteine durch Dsk1 und/oder Lkh1 Kinase notwendig, um diese aus den *Speckles* frei zu lassen. Sind die Kinasen deletiert, würden die SR Proteine in den *Speckles* verbleiben und können dementsprechend nicht an die prä-mRNA binden.

Zusammengefasst bedeutet dies, dass die Prp4 Kinase zusammen mit den SR Proteinen und den beiden nicht-essentiellen Kinasen Dsk1 und Lkh1 Komponenten eines Mechanismus sind, der in *S. pombe* das Herausspleißen von Introns mit schwachen 5'-Exon/5'-SSs und BSs/3'-SSs sicherstellt und koordiniert. Bei Prp4-unabhängigen Introns wird diese Koordination, die zur transienten Stabilisierung eines prä-Spleißosoms durch die SR Proteine führt, vermutlich nicht benötigt. Die Interaktion zwischen der starken X₃X₂X₁/5'-SS und der U1 snRNA ist wahrscheinlich ausreichend, damit das Intron erkannt und gespleißt wird. Da das prä-mRNA Spleißen Teil der eukaryotischen Genexpression ist,

ist dieser Mechanismus in *S. pombe* vermutlich ein Kontrollmechanismus auf Transkriptionsebene, über den Genexpression reguliert wird.

5 Spleißen als Teil der Genexpression in *S. pombe*

Warum besitzt *S. pombe* nun schwache SSs und BSs und Komponenten, wie die Prp4 Kinase und SR Proteine, die das effiziente Herausspleißen der Introns sicherstellen? Wie bereits zuvor diskutiert, ist das prä-mRNA Spleißen ein Teil der eukaryotischen Genexpression. Eukaryotische Genexpression wird durch die Chromatinstruktur der DNA, die Transkription, den mRNA Export aus dem Kern und die Translation beeinflusst und reguliert (Braunschweig et al., 2013). In vielzelligen Eukaryoten findet nicht nur das konstitutive Spleißen sondern auch das regulierte alternative Spleißen (AS) statt. Während des AS werden weitere Spleißfaktoren benutzt, um zwischen verschiedenen SSs die Richtige zu verwenden. AS produziert verschiedene Isoformen eines Transkripts. In *H. sapiens*, in denen kurze Exons durch lange Introns unterbrochen sind, produzieren 95 % der Multi-Exon-Gene alternativ gespleißte Transkripte (Pan et al., 2008; Wang et al., 2008). Dabei hat AS zahlreiche Rollen in kritischen biologischen Prozessen. Ein Transkript kann beispielsweise als Reaktion auf einen Umwelteinfluss alternativ gespleißt werden. AS findet aber auch während der Zelldifferenzierung statt. Dabei wird das Spleißen unterschiedlicher Geneprodukte in spezifischen Geweben reguliert (Irimia und Blencowe, 2012). In *S. pombe* konnte reguliertes AS bisher nicht nachgewiesen werden. *S. pombe* hat ausschließlich lange Exons, die durch kurze Introns unterbrochen sind. Außerdem hat *S. pombe* im Vergleich zu *H. sapiens* nur zwei Proteine der SR-Familie. Dennoch scheint die Prp4 Kinase sowie die SR Proteine Teil eines Mechanismus während des konstitutiven Spleißens zu sein, durch den sich die Zelle schneller an unterschiedliche Umweltbedingungen anpassen kann und effizientes Spleißen von Introns sichergestellt wird. Das Spleißen in *S. pombe* scheint ein wichtiger Teil der Genexpression dieses einzelligen Organismus zu sein und ist vermutlich eine Grundform des regulierten Spleißens. Dieses hat sich in höheren Eukaryoten im Lauf der Evolution weiterentwickelt, wodurch letztendlich AS ermöglicht wurde.

6 Ausblick

Das dargestellte Modell wirft viele neue Fragen auf, die zukünftig experimentell untersucht werden können. Nachdem gezeigt wurde, dass die SR Proteine zusammen mit den Kinasen, Dsk1 und Lkh1, an dem Prp4 Kinase-abhängigen Mechanismus bei der Intronerkennung beteiligt sind, stellt sich nun die Frage welche Funktion die SR Proteine haben. Dabei könnte *in vitro* mit Hilfe eines *Electrophoretic Mobility Shift Assays* (EMSA) untersucht werden, ob es spezifische Sequenzen gibt, an die SR Proteine binden und ob sie unterschiedliche Sequenzen bevorzugen. Eine andere Möglichkeit wäre ein CLIP-Seq (engl. *cross-linking immunoprecipitation and high-throughput sequencing*) durchzuführen, um bevorzugte spezifische Sequenzen *in vivo* identifizieren zu können. Anschließend könnte *in silico* überprüft werden, ob diese Sequenzen in allen Exons oder nur in jenen, die an Prp4-abhängig gespleißte Introns angrenzen, zu finden sind. Daraus könnten Schlüsse gezogen werden, ob der beschriebene Mechanismus ein genereller Mechanismus für alle Introns in *S. pombe* ist oder nur die betrifft, die schwache SSs und BSs besitzen. Es könnte sein, dass der beschriebene Mechanismus nur bei Introns mit schwachen SSs und BSs abläuft und die SR Proteine erst benötigt werden, wenn der U1 snRNP nicht sofort binden kann. Es könnte aber auch sein, dass die SR Proteine generell an der Erkennung aller Introns beteiligt sind. Bei Introns mit starken SSs und BSs würde es folglich nicht stören, wenn die SR Proteine im 5'-Exon binden und die Prp4_{as2} Kinase inhibiert wird, da die Interaktion zwischen U1 snRNA und prä-mRNA stark genug ist, damit das Intron trotzdem erkannt und gespleißt wird. Zur Überprüfung, ob die SR Proteine nicht mehr an die prä-mRNA binden, wenn die Dsk1 und Lkh1 Kinase in der Zelle fehlen, könnte eine RIP mit den SR Proteinen durchgeführt werden. Außerdem könnten durch Ko-Immunopräzipitation Interaktionspartner der SR Proteine identifiziert werden. Dabei könnten insbesondere Proteine des U1 snRNPs in Betracht kommen. Die Interaktion zwischen Srp2 und U1-70K könnte dadurch auch nachgewiesen werden. Des Weiteren könnten die potentiellen Phosphorylierungsstellen der neu identifizierten *in vitro* Substrate der Prp4 Kinase von Serinen/Threoninen in Alanine mutiert werden, um *in vivo* eine Phosphorylierung dieser zu verhindern und mögliche Einflüsse auf die Prp4 Kinase-Abhängigkeit zu untersuchen. In Bezug auf die Sequenzen im Exon wäre es interessant, die Mutationen, die im 5'-Exon der Reportergene gesetzt wurden, auch im 3'-Exon zu analysieren. Dadurch kann überprüft werden, ob auch die Sequenz im 3'-Exon einen Einfluss auf die Prp4-Abhängigkeit von Introns hat. Weiterhin bleibt zu klären, ob Srp2 ein *in vivo* Substrat der Prp4 Kinase ist. Um dies zu überprüfen und weitere *in vivo* Substrate identifizieren zu können, könnte eine Phosphoproteom-Analyse ohne und mit Inhibition der Prp4_{as2} Kinase durchgeführt und die Ergebnisse miteinander verglichen werden.

IV Material und Methoden

1 Material

1.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4| Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Artikelnummer
1NM-PP1	Toronto Research Company	A603003
Rotiphorese® Gel 30 (30% Acrylamid)	Roth	3029.1
Adenin	Applichem	A0939
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth	9592.2
ATP	Roth	K054.2
γ [^{32}P] ATP	Hartmann Analytic	FP-301
Agar	Serva	11396.04
Agarose	Roth	2267.3
Ammoniumchlorid	Roth	K298.2
Ampicillin	Roth	K029.4
Bacto Malt Extrakt	Merck	105391
Bacto™ Yeast Extract	BD	212750
Benzamidin Hydrochlorid	Roth	CN38.1
Borsäure	Roth	6943.3
Brilliant Blau R250	Roth	3862.1
Bromphenolblau	Sigma	B5525
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Merck	2382
Calcofluor White	Sigma	F6259
Chloramphenicol	Roth	3886.2
Chloroform	Roth	3313.2
cOmplete™ EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	Roche	04693132001
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Merck	2790
DAPI	Roth	6335.1
d-Biotin	Sigma	B4501
DEPC-Wasser	Roth	T143.3
di-Natriumhydrogenphosphat dihydrat	Roth	4984.1
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roth	6908.1
DMSO	Roth	A994.1

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Chemikalie	Hersteller	Artikelnummer
dNTPs	Roth	K039.1
EDTA	Roth	8040.1
EDTA-Na ₂ -Salz	Roth	8043.2
Essigsäure	Roth	3738.2
Ethanol	Chemikalienlager TU BS	64-17-5
Ethidiumbromid	Biomol	54542
FeCl ₃ ·6H ₂ O	Merck	3943
Formaldehydlösung 37%	Roth	4979.1
Geneticindisulfat G418	Roth	0239.4
Glasperlen 0,5 mm	Roth	N030.1
Glukose	Roth	6780
Glutathion Sepharose 4B	GE Healthcare	17-0756-01
Glycerin	Roth	3783.2
Glycin	Roth	3908.3
HCl	Roth	A0659
HEPES	Roth	9105.2
IgG-Sepharose 6 Fast Flow	GE Healthcare	17-0969-01
IPTG	Roth	2316.3
Isopropanol	Roth	6752.4
Kaliumhydrogenphtalat	Roth	P750.2
KCl	Roth	6781.1
KH ₂ PO ₄	Roth	3904.1
KJ	Merck	5043
KOAc	Roth	4986.1
KOH	Merck	5033
L-Histidin	Roth	3852.3
Lithiumacetat	Roth	5447.1
Lithiumchlorid	Sigma	L-9650
LiSD ₂	Sigma	L4632
L-Leucin	Applichem	A3460
L-Lysin	Merck	105.700
L-Tryptophan	Merck	8375
Lysozym	Biomol	MB-109-1000

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Chemikalie	Hersteller	Artikelnummer
Mangan(II)-chlorid-Tetrahydrat	Applichem	A2087
2-Mercaptoethanol	Biomol	nicht lesbar
Meso-Inositol	Roth	6329.1
Methanol	Applichem	A2954
MgCl ₂ ·6H ₂ O	Roth	2189.1
MgSO ₄	Sigma	M1880
MnSO ₄ ·H ₂ O	Merck	5963
MoO ₃	Merck	403
MOPS	Serva	29836
Na ₂ HPO ₄	Roth	4984.1
Na ₂ SO ₄	Sigma	S-9627
NaCl	Roth	3957.2
NaOH	Roth	P031.1
Natriumacetat	Roth	6771.1
Natriumdesoxycholat	Merck	6504
clonNAT (Nourseothricin)	Werner	CAS#96736-11-7
Nikotinsäure	Roth	3815.1
NP-40	Applichem	A1694
Pantothensäure	Merck	2316
PEG 3350	Sigma	P3640
PEG 4000	Roth	0156.1
PEG 8000	Roth	0263.1
PMSF	Applichem	A0999
Phenol/Chloroform (PCIA)	Roth	A156.2
PreScission Protease	GE Healthcare	27-0843-01
Protein G Sepharose™ 4 Fast Flow	GE Healthcare	17-0618-01
RNAse A	Thermo Scientific	EN0531
Rubidiumchlorid	Applichem	A4240
Saccharose	Roth	9097.1
SDS	Biorad	161-0416
SDS	Roth	2326.2
Spermidin	Roth	716.1
ssDNA	Sigma	D1626

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Chemikalie	Hersteller	Artikelnummer
TEMED	Roth	2367.1
Tetracyclin	Sigma	T7660
Thiamin-Hydrochlorid	Roth	T911.2
Tris	Roth	4855.3
Triton X-100	Roth	3051.3
Trypton/Pepton aus Casein	Roth	8952.2
Uracil	Roth	7288.3
Yeast Nitrogen Base	Difco	291940
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	Merck	8883

1.2 Geräte, Zentrifugen und Rotoren

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte sowie Zentrifugen und Rotoren sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5| Geräte, Zentrifugen und Rotoren

Geräte / Zentrifugen und Rotoren	Hersteller
BeadBeater Precellys24	Peqlab
ChemiDoc Touch Imaging System	Bio-Rad
French Pressure Cell	Thermo Fisher Scientific
French Pressure Cell Press	Polytec
Geldokumentationsanlage	Bio-Rad
Gelkammer für Agarosegele Horizon 58	Gibco BRL
Kühlzentrifuge Fresco	Heraeus
Megafuge 1.0	Heraeus
Mikromanipulator	Singer Instruments
Inverses Mikroskop Axio Observer Z1	Zeiss
NanoPhotometer C40	Implen
Rotationsmischer LD-79	Labor-Brand
Sonicator Bioruptor® plus	Diagenode
Sorvall RC5C, Rotoren: HB-4, GS-3, SS34	Dupont
Speed Vac Plus SC110A	Savant
Thermocycler Mastercycler personal	Eppendorf
Tischzentrifuge Biofuge 13	Heraeus
Tischzentrifuge Pico	Heraeus

2 Stämme und Kulturbedingungen

2.1 Stämme und Medien für *S. pombe*

Die in dieser Arbeit verwendeten *S. pombe* Stämme sind in Tabelle 6 gezeigt. Sie sind von den von Leupold beschriebenen Stämmen abgeleitet (Leupold, 1950). Die Stämme wurden der Stammsammlung des Instituts für Genetik entnommen. Stammnummer, Paarungstyp und Genotyp sind angegeben.

Tabelle 6| *S. pombe* Stämme

Nr.	Paarungs- und Genotyp
L972	<i>h^S</i>
801	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R</i>
812	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32</i>
829	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R usp101:int::usp101-HA-kan^R</i>
832	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 usp107:int::usp107-HA-kan^R</i>
833	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32 brr2:int::brr2-HA-kan^R</i>
835	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R lea1:int::lea1-TAP-kan^R</i>
984	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R rpb3:int::rpb3-HA-Nat^R</i>
1045	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R srp2:int::his7 leu1-32:int::pJKnmt81-srp2</i>
1059	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R srp1:int::ura4 srp2:int::his7 leu1-32:int::pJKnmt81-srp2</i>
1060	<i>h^N prp4:int::prp4-as2-kan^R srp1:int::ura4 leu1-32</i>
1105	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R dsk1:int::ura4</i>
1111	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32:int::pML81HA-res1'-WT.K</i>
1112	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32:int::pML81HA-res1'-Mut1U.K</i>
1113	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32:int::pML81HA-res1'-Mut2U.K</i>
1114	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32:int::pML81HA-res1'-Mut3U.K</i>
1115	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32:int::pML81HA-res1'-Mut4U.K</i>
1116	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32:int::pML81HA-res1'-Mut5U.K</i>
1129	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32:int::pML81HA-res1'-Mut3A.K</i>
1130	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32:int::pML81HA-res1'-Mut3C.K</i>
1134	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32:int::pML81HA-res1'-Mut4G.K</i>
1135	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32:int::pML81HA-res1'-Mut5G.K</i>
1139	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32 usp103:int::Nat^R-usp103-HA</i>
1141	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R usp102:int::Nat^R-HA-usp102</i>
1142	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R msl1:int::msl1-HA-Nat^R</i>
1151	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32:int::pML81HA-res1'-Mut1A.K</i>
1152	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32:int::pML81HA-res1'-Mut1C.K</i>

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Nr.	Paarungs- und Genotyp
1153	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32:int ::pML81HA-res1'-Mut1G.K</i>
1154	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32:int ::pML81HA-res1'-Mut2A.K</i>
1155	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32:int ::pML81HA-res1'-Mut2G.K</i>
1162	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32:int ::pML81HA-res1'-Mut2C.K</i>
1163	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32:int ::pML81HA-res1'-Mut4A.K</i>
1164	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32:int ::pML81HA-res1'-Mut4C.K</i>
1165	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32:int ::pML81HA-res1'-Mut5A.K</i>
1166	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32:int ::pML81HA-res1'-Mut5C.K</i>
1176	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R dsk1:int::ura4 lkh1:int::ura4</i>
1179	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R lkh1:int::ura4</i>
1181	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32:int ::pML81HA-res1'-Mut3G.K</i>
1183	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R uaf2:int::Nat^R-uaf2-HA</i>
1184	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R bpb1:int::Nat^R-HA-bpb1</i>
1185	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32:int ::pML81HA-res1'-1.K</i>
1187	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32:int ::pML81HA-res1'-1Mut1U.K</i>
1189	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32:int ::pML81HA-res1'-1Mut2G.K</i>
1191	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32:int ::pML81HA-res1'-1Mut2U.K</i>
1194	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32:int ::pML81HA-res1'-1Mut1G.K</i>
1196	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32:int ::pML81HA-res1'-1Mut1C.K</i>
1197	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32:int ::pML81HA-res1'-1Mut1A.K</i>
1199	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32:int ::pML81HA-res1'-1Mut2A.K</i>
1201	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32:int ::pML81HA-res1'-1Mut2C.K</i>
1233	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32:int ::pML81HA-res1'-Mut1.5.K</i>
1234	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32:int ::pML81HA-res1'-Mut1.4.K</i>
1235	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32:int ::pML81HA-res1'-Mut1.2.K</i>
1243	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32:int ::pML81HA-res1'-Mut1.8.K</i>
1244	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32:int ::pML81HA-res1'-Mut1.7.K</i>
1255	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32:int ::pML81HA-res1'-Mut1.1.K</i>
1259	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32:int ::pML81HA-res1'-Mut1.3.K</i>
1260	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32:int ::pML81HA-res1'-Mut1.9.K</i>
1261	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32:int ::pML81HA-res1'-Mut1.10.K</i>
1262	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32:int ::pML81HA-res1'-Mut1.13.K</i>
1267	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32:int ::pML81HA-res1'-Mut1.12.K</i>

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Nr.	Paarungs- und Genotyp
1268	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32:int::pML81HA-res1⁻-Mut1.6.K</i>
1269	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32:int::pML81HA-res1⁻-Mut1.11.K</i>
1273	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32:int::pML81HA-trs402⁻-WT.N</i>
1277	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R srp2:int::srp2-mNeonGreen-Nat^R</i>
1278	<i>h^{+N} prp4:int::prp4-as2-kan^R srp2:int::srp2-mNeonGreen-Nat^R ura4-D18 leu1-32</i>
1280	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32:int::pML81HA-trs402⁻-1.N</i>
1284	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32:int::pML81HA-trs402⁻-Mut1U.N</i>
1285	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32:int::pML81HA-trs402⁻-Mut1A.N</i>
1286	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32:int::pML81HA-trs402⁻-Mut1G.N</i>
1296	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R srp2:int::srp2-mNeonGreen-Nat^R dsk1:int::ura4</i>
1297	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R srp2:int::srp2-mNeonGreen-Nat^R lkh1:int::ura4</i>
1298	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R srp2:int::srp2-mNeonGreen-Nat^R dsk1:int::ura4 lkh1:int::ura4</i>
1303	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32:int::pML81HA-trs402⁻-1Mut1A.N</i>
1309	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32:int::pML81HA-trs402⁻-1Mut1G.N</i>
1314	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32:int::pML81HA-res1⁻-Mut1.15.K</i>
1315	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32:int::pML81HA-res1⁻-Mut1.14.K</i>
1317	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32:int::pML81HA-trs402⁻-1Mut1C.N</i>
1318	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32:int::pML81HA-trs402⁻-1Mut1U.N</i>
1319	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32:int::pML81HA-trs402⁻-Mut1C.N</i>
1325	<i>h^S prp4:int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32:int::pML11-mNeonGreen</i>

Zur Kultivierung der *S. pombe* Stämme wurden die in Tabelle 7 beschriebenen Medien verwendet. Die Zusammensetzung dieser wurde zuvor von Egel (1971), Gutz et al. (1974) und Moreno et al. (1991) beschrieben. Bei Bedarf wurden zum YE und EMM 75 mg/L Adenin, 100 mg/L L-Histidin, 150mg/L L-Leucin, 50 mg/L Lysin oder 100 mg/L Uracil zugegeben. Bei der Selektion durch Antibiotika wurden 150 mg/L Geneticin (kan^R) oder 100 mg/L Nourseothricin (nat^R) verwendet.

Tabelle 7| Medien und Lösungen *S. pombe*

Medien und Lösungen	Zusammensetzung
Edinburgh Minimal Medium (EMM) 20 g/L Agar	20 g/L Glukose 3 g/L Kaliumhydrogenphthalat 2,2 g/L Na ₂ HPO ₄ 5 g/L NH ₄ Cl 20 mL/L Salzlösung (Stock x 50) 1 mL/L A1 (Stock x 1000) 1 mL/L A3a (nach dem autoklavieren, Stock x 1000) 1 mL/L A3b (nach dem autoklavieren, Stock x 1000)
Yeast Extrakt (YE) 20 g/L Agar	30 g/L Glukose 5 g/L Hefeextrakt
Malz Extrakt (MEA) 20 g/L Agar	30 g/L Bacto Malz Extrakt Alle Aminosäuren
Sporulations Medium (SPA) 30 g/L Agar (gelöst in H ₂ O _{bidest.})	10 g/L Glukose 1 g/L KH ₂ PO ₄ Alle Aminosäuren 1 mL/L A3a (nach dem autoklavieren, Stock x 1000) 1 mL/L A3b (nach dem autoklavieren, Stock x 1000)
50 x Salzlösung Autoklavieren	52,5 g/L MgCl ₂ ·6H ₂ O 0,735 g/L CaCl ₂ ·2H ₂ O 50 g/L KCl 2 g/L Na ₂ SO ₄
1000 x Minerallösung A1	500 mg/L H ₃ BO ₃ 40 mg/L CuSO ₄ ·5H ₂ O 200 mg/L FeCl ₃ ·6H ₂ O 530 mg/L MnSO ₄ ·H ₂ O 117 mg/L MoO ₃ 400 mg/L ZnSO ₄ ·7H ₂ O 100 mg/L KJ
1000 x Vitaminlösung A3a (steril-filtriert)	1 g/L Pantothensäure 10 g/L Nikotinsäure 10 g/L Meso-Inositol
1000 x Vitaminlösung A3b	10 mg/L d-Biotin (gelöst in 50 % EtOH)

2.2 Stämme und Medien für *S. cerevisiae*

Der in Tabelle 8 beschriebene *S. cerevisiae* Stamm wurde in dieser Arbeit zur Durchführung des *Yeast Recombinational Cloning* (YRC) verwendet.

Tabelle 8| *S. cerevisiae* Stamm

Stamm	Genotyp
FY834	<i>Mata his3Δ200 ura3–52 leu2Δ1 lys2Δ202 trp1Δ63</i>

Zur Kultivierung von *S. cerevisiae* wurden die in Tabelle 9 beschriebenen Medien verwendet. Bei Bedarf wurden dem Synthetisch definierten (SD) Medium 20 mg/L L-Uracil zugesetzt.

Tabelle 9| Medien *S. cerevisiae*

Medien	Zusammensetzung
Yeast Extract Peptone Dextrose (YPD) 20 g/L Agar	10 g/L Hefeextrakt 20 g/L Pepton 20 g/L Glukose
Synthetic Defined (SD) 20 g/L Agar	7,6 g/L Yeast Nitrogen Base (Difco) 20 g/L Glukose 20 mg/L L-Tryptophan 20 mg/L L-Histidin-HCl 30 mg/L L-Leucin 30 mg/L L-Lysin-HCl

2.3 Stämme und Medien für *Escherichia coli*

Die in Tabelle 10 gezeigten Stämme wurden in dieser Arbeit für die Vermehrung von Plasmid-DNA, Überexpression von Proteinen, *Pfu*- oder M13-Mutagenese verwendet.

Tabelle 10| *E. coli* Stämme

Stamm	Genotyp
XL1-Blue MRF ⁺	$\Delta(\text{mcrA})183 \Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI}^q\text{Z}\Delta\text{M15 Tn10 (Tet}^r\text{)]}$
DH5 α^{TM}	$\text{F}^- \text{ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG } \Phi 80\text{dlacZ}\Delta\text{M15 } \Delta(\text{lacZYA-argF})\text{U169, hsdR17(r}_K^- \text{ m}_K^+), \lambda^-$
CJ236	$\text{F}\Delta(\text{HindIII})::\text{cat (Tra}^+ \text{ Pil}^+ \text{ Cam}^R)/ \text{ ung-1 relA1 dut-1 thi-1 spoT1 mcrA fhuA2 [lon] ompT gal } (\lambda \text{ DE3) [dcm] } \Delta\text{hsdS}$
BI21	$\text{F}^- \text{ ompT gal [dcm] fhuA2 [lon] hsdS}_B(\text{r}_B^- \text{ m}_B^-)$

Für die Kultivierung der *E. coli* Stämme wurden die Medien in Tabelle 11 verwendet. Bei Bedarf wurden dem Medium die Antibiotika aus Tabelle 12 hinzugefügt.

Tabelle 11| *E. coli* Medien

Medien	Zusammensetzung
Lysogeny broth (LB) 15 g/L Agar	5 g/L Hefeextrakt 10 g/L Trypton/Pepton 10 g/L NaCl
dYT-Medium	10 g/L Hefeextrakt 16 g/L Trypton/Pepton 5 g/L NaCl
M13-Agarplatten 12 g/L Agar	5 g/L Hefeextrakt 8 g/L Trypton/Pepton 5 g/L NaCl
Top-Agar 7 g/L Agar	10 g/L Trypton/Pepton 5 g/L NaCl 0,5 ml/L 1M MgSO ₄

Tabelle 12| Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/mL in H ₂ O	100 µg/mL
Tetracyclin	12,5 mg/mL in 70 % EtOH	25 µg/mL
Chloramphenicol	34 mg/mL in EtOH	34 µg/mL

3 Vektoren und Konstrukte

Für die Herstellung aller Konstrukte wurden die Vektoren aus Tabelle 13 verwendet.

Tabelle 13| Vektoren

Vektor	Hersteller
M13mp18/19	Boehringer
pGEX-6P-1	Amersham
pUC18/19	University of California (UC)
pRS426	ATCC
pML81HA	Martin Lützelberger, TU Braunschweig

3.1 pGEX-6P-1 Vektor

Für die Proteinüberexpression wurde der pGEX-6P-1 Vektor von Amersham benutzt. Zur Herstellung der Konstrukte wurde die cDNA der in Tabelle 14 aufgeführten Gene durch PCR amplifiziert und über die entsprechenden Schnittstellen in den Polylinker des pGEX-6P-1 Vektors kloniert (Abbildung 46). Die Gene wurden am 3'-Ende des GST-Tags angefügt. Dabei wurde bei einigen das Startcodon entfernt, um die Stabilität der Fusionsproteine zu erhöhen.

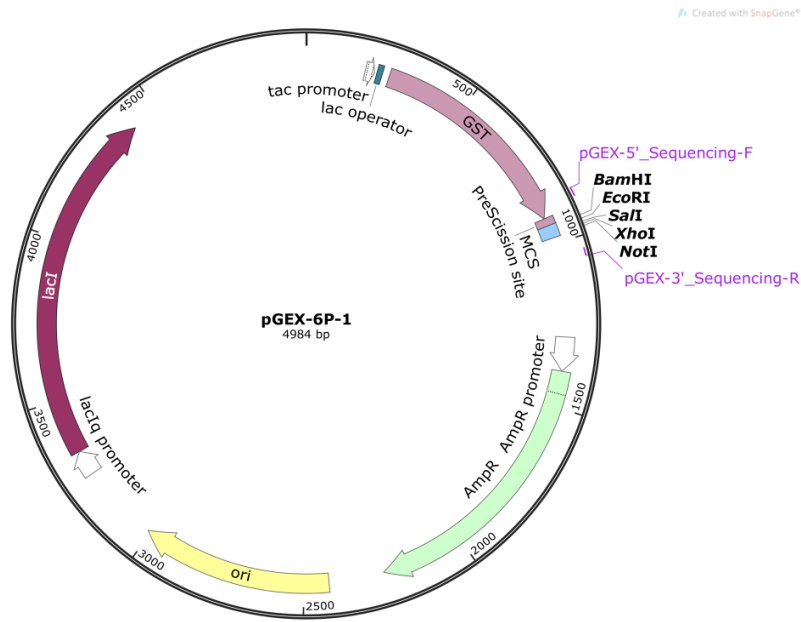


Abbildung 46| Der Überexpressionsvektor pGEX-6P-1

Vektorkarte des pGEX-6P-1. Die verschiedenen Gene aus Tabelle 14 wurden über die dort angegebenen Schnittstellen in den Polylinker (MCS) des Vektors im Leseraster mit dem Startcodon des GST-Tags kloniert. Folgende Konstrukte waren schon vorhanden: pGEX-6P-1-Bpb1, pGEX-6P-1-Prp4, pGEX-6P-1-Rsd1 und pGEX-6P-1-Srp2. GST, Glutathione S-Transferase; *tac* Promotor; *lac* Operator; PreScission site, Erkennungssequenz für PreScission Protease; *AmpR*, Ampicillin-Resistenzgen; *ori*, Replikationsursprung; *lacI*, Lac Repressor Protein .

Tabelle 14| Primer zur Amplifikation der Fragmente für die Proteinüberexpression

Restriktionsschnittstellen sind kursiv und unterstrichen. Das Starttriplet und das Stopp-Codon sind dick gedruckt.

Gen	Oligo	Sequenz 5'-3'	Tm [°C]
<i>dsk1</i>	Dsk1-BamHI-F	ATAGGATCC GGA AGTGACGGGTCG	58
	Dsk1-XhoI-R	ACGCCTCGAG CTA ACGAATTTTCAGTAGCCC	
<i>prp2</i>	Prp2-BamHI-F	ATAGGATCC GAT TTGTCTTCCAGATTATCATC	58
	Prp2-XhoI-R	ACGCCTCGAG TCA CCATGCATTAGCTTTATAGC	
<i>lkh1</i>	Lkh1_EcoRI-F	ATAGAATTCC CAT TCCTTAAACGTCGTAG	58
	Lkh1_NotI-R	ACGC GCGGCCG C TCA CAAATTTGAAGAAATTGGTTG	
<i>srp1</i>	Srp1_BamHI-F	ATAGGATCC AGT CGCAGAAGCCTTCG	58
	Srp1_SalI-R	ACGCGT CGAC TTA TTGAGACTCTGTAGTAGTAGGG	

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Gen	Oligo	Sequenz 5'-3'	Tm [°C]
<i>uaf2</i>	Uaf2_EcoRI-F	ATAGAATT <u>CGCA</u> AGTCATTTGGCAAG	58
	Uaf2_SalI-R	ACGC <u>GTCGAC</u> <u>TTA</u> ATTTTTGCGTTCAGCAG	
<i>usp101</i>	Usp101_EcoRI-F	ATAGAATT <u>CATG</u> GCTGAAAAATTACCGGCTC	58
	Usp101_SalI-R	ACGC <u>GTCGAC</u> <u>TCA</u> ATTGTAGCGACGACGCT	
<i>usp102</i>	Usp102_EcoRI-F	ATAGAATT <u>CATG</u> GATCCTCAAACAAATTTCGC	58
	Usp102_SalI-R	ACGC <u>GTCGAC</u> <u>CTA</u> CGAGGCCTTCCGAGC	
<i>usp103</i>	Usp103_EcoRI-F	ATAGAATT <u>CATG</u> CCAAGATATTTGTGTGATTAC	58
	Usp103_SalI-R	ACGC <u>GTCGAC</u> <u>TTA</u> AGCACGTACAAACCTTTGATG	
<i>usp107</i>	Usp107_EcoRI-F	ATAGAATT <u>CATG</u> CAGCGGCAGAATACGC	58
	Usp107_SalI-R	ACGC <u>GTCGAC</u> <u>TTA</u> TGCTTCAGAACGTAAAATCAG	

3.2 Konstruktion und Mutagenese des *res1*'- und *trs402*'-Reportergens

Um zu untersuchen, ob es spezifische Sequenzen im Exon1 des Prp4-abhängigen *res1*-Introns gibt, an die SR Proteine binden können, wurde ein Reportergen konstruiert, das in den letzten 50 Nukleotiden des Exon1 Mutationen enthält. Dazu wurde das *res1*-Gen nach Amplifikation des Gens mittels PCR über die Schnittstellen *Bam*HI und *Sal*I in den M13mp18 bzw. pUC19 Vektor kloniert (Daniela Eckert, 2015). Mit Hilfe dieser Plasmide wurde dann die M13- bzw. *Pfu*-Mutagenese durchgeführt, um das Exon1 des *res1*'-Gens zu verändern. Zeitgleich wurde außerdem bei allen Mutationen im Exon1 eine zusätzliche *Kpn*2I Schnittstelle erzeugt, um die positiven Plasmide identifizieren zu können. Als zweites Reportergen wurde *trs402* verwendet. Auch bei diesem Reportergen sollte untersucht werden, ob es spezifische Sequenzen im Exon1 des Prp4-unabhängigen *trs402*-Introns gibt, an die SR Proteine binden können. Die Klonierung des *trs402*-Gens in den M13mp18 Vektor erfolgte nach Amplifikation des Gens mittels PCR über die Schnittstellen *Bam*HI und *Sal*I. Mit Hilfe dieses Plasmids wurde dann die M13 Mutagenese durchgeführt, um das Exon1 des *trs402*'-Gens zu verändern. Zeitgleich wurde außerdem bei allen Mutationen im Exon1 eine zusätzliche *Nco*I Schnittstelle erzeugt, um die positiven Plasmide identifizieren zu können. Nach erfolgreicher Mutagenese der Gene wurden diese in den pML81HA Vektor subkloniert und die Konstrukte über Linearisierung des Vektors in den *leu1*-Lokus der Spaltheife integriert. Ein Teil der *res1*' und der *trs402*' Konstrukte, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind im Laufe der Masterarbeiten von Laura Möller (2017) und Lena Stiefvatter (2018) und der Bachelorarbeit von Ariane Bader (2017) entstanden.

Die für die Mutagenese verwendeten Primer sind in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15| Mutagenese-Primer *res1'* und *trs402'*

Restriktionsschnittstellen sind kursiv und unterstrichen. Der zu mutierende Bereich ist dick gedruckt und eingefügte Mutationen sind in Kleinbuchstaben hervorgehoben.

Oligo	Sequenz 5'-3'
res1_BamHI-F	CTCGGTACCCGGGATCC
res1_SalI-R	CATGCCTGCAGGTCGACAG
res1'-WT.K	Pho-GCGAATTTCcggAGAATCCTTGTC
res1'-Mut1U.K	Pho-CACAAACCTT aAaAaaaaa ACAACCACCTTGAATTTTTTCATGAAGTCCTTTTGAGCGAA TTTCcggAGAATCCTTG
res1'-Mut1C.K	Pho-CACAAACCTT Gggggggggg ACAACCACCTTGAATTTTTTCATGAAGTCCTTTTGAGCGAA TTTCcggAGAATCCTTG
res1'-Mut1A.K	Pho-CACAAACCTT ttTtTTTTtt ACAACCACCTTGAATTTTTTCATGAAGTCCTTTTGAGCGAA TTTCcggAGAATCCTTG
res1'-Mut1G.K	Pho-CACAAACCTT ccccccccCC ACAACCACCTTGAATTTTTTCATGAAGTCCTTTTGAGCGAA TTTCcggAGAATCCTTG
res1'-Mut2U.K	Pho-GATATTTTCC AaAaaAaaa TGAATTTTTTCATGAAGTCCTTTTGAGCGAATTTCcggAGA ATCCTTG
res1'-Mut2C.K	Pho-GATATTTTCC gggggggggg TGAATTTTTTCATGAAGTCCTTTTGAGCGAATTTCcggAGA ATCCTTG
res1'-Mut2A.K	Pho-GATATTTTCC tttttttttt TGAATTTTTTCATGAAGTCCTTTTGAGCGAATTTCcggAGA ATCCTTG
res1'-Mut2G.K	Pho-GATATTTTCC cCccCccCC TGAATTTTTTCATGAAGTCCTTTTGAGCGAATTTCcggAGA ATCCTTG
res1'-Mut3U.K	Pho-ACAACCACCT aaAaaaaaa CATGAAGTCCTTTTGAGCGAATTTCcggAGAATCCTTG
res1'-Mut3C.K	Pho-ACAACCACCT gGgggggggg CATGAAGTCCTTTTGAGCGAATTTCcggAGAATCCTTG
res1'-Mut3A.K	Pho-ACAACCACCT TtttTTTTTT CATGAAGTCCTTTTGAGCGAATTTCcggAGAATCCTTG
res1'-Mut3G.K	Pho-ACAACCACCT cccccccccc CATGAAGTCCTTTTGAGCGAATTTCcggAGAATCCTTG
res1'-Mut4U.K	Pho-CCTTGAATTTTT aAaaAaaaa CTTTTGAGCGAATTTCcggAGAATCCTTG
res1'-Mut4C.K-F	GACAAGGATTC TccgGAAATTCGCTCAAAAGcccCccCccc AAAAAATTC AAGG
res1'-Mut4C.K-R	CCTTGAATTTTT gggGggGggg CTTTTGAGCGAATTTCcggAGAATCCTTGTC
res1'-Mut4A.K-F	GACAAGGATTC TccgGAAATTCGCTCAAAAGaaAaaaaAaa AAAAAATTC AAGG
res1'-Mut4A.K-R	CCTTGAATTTTT ttTttttTtt CTTTTGAGCGAATTTCcggAGAATCCTTGTC
res1'-Mut4G.K-F	GACAAGGATTC TccgGAAATTCGCTCAAAAGGGggggggg GAAAAAATTC AAGG
res1'-Mut4G.K-R	CCTTGAATTTTT TCccccccCCTTTTGAGCGAATTTCcggAGAATCCTTGTC
res1'-Mut5U.K	Pho-CATGAAGTCC aaaAaaaaa AATTTCcggAGAATCCTTGTC
res1'-Mut5C.K-F	GACAAGGATTC TccgGAAATTCcCcCcccc GGACTTCATGAAAAAATTC AAGG
res1'-Mut5C.K-R	CCTTGAATTTTTTCATGAAGTCC gggggGgGg GAATTTCcggAGAATCCTTGTC
res1'-Mut5A.K-F	GACAAGGATTC TccgGAAATTaaaaaAAAAa GGACTTCATGAAAAAATTC AAGG
res1'-Mut5A.K-R	CCTTGAATTTTTTCATGAAGTCC tTTTTttttt AATTTCcggAGAATCCTTGTC

Fortsetzung auf der nächsten Seite

IV Material und Methoden

Oligo	Sequenz 5'-3'
res1'-Mut5G.K-F	GACAAGGATTCTccgGAAATTgGgggggggGGGACTTCATGAAAAAATCAAGG
res1'-Mut5G.K-R	CCTTGAATTTTTTCATGAAGTCCCcccccccCcaATTTCcggAGAATCCTTGTC
res1'-1Mut1U.K	Pho-CACttACCTTaAaAaaaaaACAACCACCTTGAATTTTTTCATGAAGTCCCTTTTGAGCGAA TTTCcggAGAATCCTTG
res1'-1Mut1C.K	Pho-CACttACCTTGgggggggggACAACCACCTTGAATTTTTTCATGAAGTCCCTTTTGAGCGAA TTTCcggAGAATCCTTG
res1'-1Mut1A.K	Pho-CACttACCTTtTtTTTTtACAACCACCTTGAATTTTTTCATGAAGTCCCTTTTGAGCGAA TTTCcggAGAATCCTTG
res1'-1Mut1G.K	Pho-CACttACCTTcccccccCCACAACCACCTTGAATTTTTTCATGAAGTCCCTTTTGAGCGAA TTTCcggAGAATCCTTG
res1'-1Mut2U.K	Pho-CTTGAAgCtTTCcAaAaaaAaaaTGAATTTTTTCATGAAGTCCCTTTTGAGCGAATTTCcgg AGAATCCTTG
res1'-1Mut2C.K	Pho-CTTGAAgCtTTCcgggggggggTGAATTTTTTCATGAAGTCCCTTTTGAGCGAATTTCcgg AGAATCCTTG
res1'-1Mut2A.K	Pho-CTTGAAgCtTTCcttttttttTGAATTTTTTCATGAAGTCCCTTTTGAGCGAATTTCcgg AGAATCCTTG
res1'-1Mut2G.K	Pho-CTTGAAgCtTTCcCccCCcCCcTGAATTTTTTCATGAAGTCCCTTTTGAGCGAATTTCcgg AGAATCCTTG
res1'-Mut1.1.K	Pho-CACAAACCTTatTATTTTtACAACCACCTTGAATTTTTTCATGAAGTCCCTTTTGAGCGAA TTTCcggAGAATCCTTG
res1'-Mut1.2.K	Pho-CACAAACCTTatTATTTTaaACAACCACCTTGAATTTTTTCATGAAGTCCCTTTTGAGCGAA TTTCcggAGAATCCTTG
res1'-Mut1.3.K	Pho-CACAAACCTTGtTtTTTTtACAACCACCTTGAATTTTTTCATGAAGTCCCTTTTGAGCGAA TTTCcggAGAATCCTTG
res1'-Mut1.4.K	Pho-CACAAACCTTGtTgTTTTtACAACCACCTTGAATTTTTTCATGAAGTCCCTTTTGAGCGAA TTTCcggAGAATCCTTG
res1'-Mut1.5.K	Pho-CACAAACCTTGtTgTTTTggACAACCACCTTGAATTTTTTCATGAAGTCCCTTTTGAGCGAA TTTCcggAGAATCCTTG
res1'-Mut1.6.K	Pho-CACAAACCTTctTtTTTTtACAACCACCTTGAATTTTTTCATGAAGTCCCTTTTGAGCGAA TTTCcggAGAATCCTTG
res1'-Mut1.7.K	Pho-CACAAACCTTctTcTTTTtACAACCACCTTGAATTTTTTCATGAAGTCCCTTTTGAGCGAA TTTCcggAGAATCCTTG
res1'-Mut1.8.K	Pho-CACAAACCTTctTcTTTTCCACAACCACCTTGAATTTTTTCATGAAGTCCCTTTTGAGCGAA TTTCcggAGAATCCTTG
res1'-Mut1.9.K	Pho-CACAAACCTTatTATTTTggACAACCACCTTGAATTTTTTCATGAAGTCCCTTTTGAGCGAA TTTCcggAGAATCCTTG
res1'-Mut1.10.K	Pho-CACAAACCTTatTATTTTCCACAACCACCTTGAATTTTTTCATGAAGTCCCTTTTGAGCGAA TTTCcggAGAATCCTTG
res1'-Mut1.11.K	Pho-CACAAACCTTGtTATTTTtACAACCACCTTGAATTTTTTCATGAAGTCCCTTTTGAGCGAA TTTCcggAGAATCCTTG
res1'-Mut1.12.K	Pho-CACAAACCTTctTATTTTtACAACCACCTTGAATTTTTTCATGAAGTCCCTTTTGAGCGAA TTTCcggAGAATCCTTG
res1'-Mut1.13.K	Pho-CACAAACCTTtATATTTTCCACAACCACCTTGAATTTTTTCATGAAGTCCCTTTTGAGCGAA TTTCcggAGAATCCTTG
res1'-Mut1.14.K	Pho-CACAAACCTTaATATTTTCCACAACCACCTTGAATTTTTTCATGAAGTCCCTTTTGAGCGAA TTTCcggAGAATCCTTG
res1'-Mut1.15.K	Pho-CACAAACCTTcATATTTTCCACAACCACCTTGAATTTTTTCATGAAGTCCCTTTTGAGCGAA TTTCcggAGAATCCTTG
res1_ESE_WT-F	CCAGGAGGACAAGGATTCTGG
res1_ESE_Mut-F	CCAGGAGGACAAGGATTCTCC
res1_E2-R	AAGGCCGGGAAAATGACTTTTT
trs402_BamHI-F	CCCGGGGATCCTAGTCCAAACTAGAAAAAG
trs402_SalI-R	CTGCAGGTCGACAAATTCGTTTTCCATAAA

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Oligo	Sequenz 5'-3'
trs402'-WT.N	Pho-GAATATATACAATA <u>ccaTGg</u> GGTACGAAAT
trs402'-Mut1U.N	Pho-AACTTACCCT aaaaaaaAaa CTGCTGTTTGTGAGTCTCCGTCCCTGTTGATGAATATATACA ATA <u>ccaTGg</u> GGTACGA
trs402'-Mut1C.N	Pho-AACTTACCCT gggGggggGg CTGCTGTTTGTGAGTCTCCGTCCCTGTTGATGAATATATACA ATA <u>ccaTGg</u> GGTACGA
trs402'-Mut1A.N	Pho-AACTTACCCT tTttTttttt CTGCTGTTTGTGAGTCTCCGTCCCTGTTGATGAATATATACA ATA <u>ccaTGg</u> GGTACGA
trs402'-Mut1G.N	Pho-AACTTACCCT CcCccCccC CTGCTGTTTGTGAGTCTCCGTCCCTGTTGATGAATATATACA ATA <u>ccaTGg</u> GGTACGA
trs402'-1.N	Pho-GTTTAACT a ACCCTCTCGTCCAGCCTGCTGTTTGTGAGTCTCCGTCCCTGTTGATGAATATA TACAATA <u>ccaTGg</u> GGTAC
trs402'-1Mut1U.N	Pho-AACT a ACCCT aaaaaaaAaa CTGCTGTTTGTGAGTCTCCGTCCCTGTTGATGAATATATACA ATA <u>ccaTGg</u> GGTACGA
trs402'-1Mut1C.N	Pho-AACT a ACCCT gggGggggGg CTGCTGTTTGTGAGTCTCCGTCCCTGTTGATGAATATATACA ATA <u>ccaTGg</u> GGTACGA
trs402'-1Mut1A.N	Pho-AACT a ACCCT tTttTttttt CTGCTGTTTGTGAGTCTCCGTCCCTGTTGATGAATATATACA ATA <u>ccaTGg</u> GGTACGA
trs402'-1Mut1G.N	Pho-AACT a ACCCT CcCccCccC CTGCTGTTTGTGAGTCTCCGTCCCTGTTGATGAATATATACA ATA <u>ccaTGg</u> GGTACGA
trs402_ESE_WT-F	CTGAAATTTTCGTACCACAGAA
trs402_ESE_Mut-F	CTGAAATTTTCGTACCCCATGG
trs402_E2-R	CGGCATCAACTTCAATTTCTG
pML_BamHI-F	CTCGGTACCCGGG <u>GATCC</u>
pML_SalI-R	GCATGCCTGCAG <u>GTCGAC</u>
OL82	GCTCCAGGATACTTGTATATTTTCGTTAAA
OL83	CGTTTACAATTTCTGATGCGGT

Nach erfolgreicher Mutagenese wurde das mutierte *res1'* bzw. *trs402'*-Gen mittels PCR amplifiziert (Primer: pML_BamHI-F + pML_SalI-R) und über die Schnittstellen *Bam*HI und *Sal*I in den pML81HA Vektor subkloniert. Dabei ist gezielt zwischen dem HA-Tag des Vektors und dem Starttriplet des *res1'* bzw. *trs402'*-Gens eine Leserasterverschiebung eingefügt worden, um sicherzustellen, dass ein stabiles Transkript aber kein funktionelles Protein gebildet werden kann, das die Hefezelle beeinflussen könnte. Anschließend wurde der Vektor im *leu1* mit *Bsi*WI linearisiert und über homologe Rekombination in den *leu1*-Lokus der Spaltheife integriert. Für die Integration wurde ein Hefestamm benutzt, der eine Mutation im *leu1*-Gen trägt und somit auxotroph für Leucin ist. Nach erfolgreicher Integration ist der Hefestamm prototroph für Leucin. Die erfolgreiche Integration in den richtigen Locus wurde außerdem durch eine Kolonie-PCR verifiziert (Primer: OL82+83).

Der verwendete Integrationsvektor pML81HA (Martin Lützelberger, TU Braunschweig) wird für die gezielte Integration in den *leu1*-Lokus von *S. pombe* benutzt. Er besitzt das *leu1*⁺-Gen, den *nmt81* Promoter sowie den *nmt1* Terminator aus *S. pombe*. Der *nmt81* Promoter ist aus dem *nmt1*⁺ Promotor entstanden, wobei sieben Nukleotide der TATA Box des *nmt1* Promotors deletiert wurden, so dass die Transkriptionsrate auf ca. 1 % des

originalen *nmt1*⁺ Promoters reduziert ist (Basi et al., 1993). Der *nmt1* Promotor ist durch Zugabe von 200 µM Thiamin reprimierbar. Der Vektor trägt außerdem einen Replikationsursprung (*ori*) und ein Ampicillin Resistenzgen (*ampR*), um ihn auch in *E. coli* verwenden zu können.

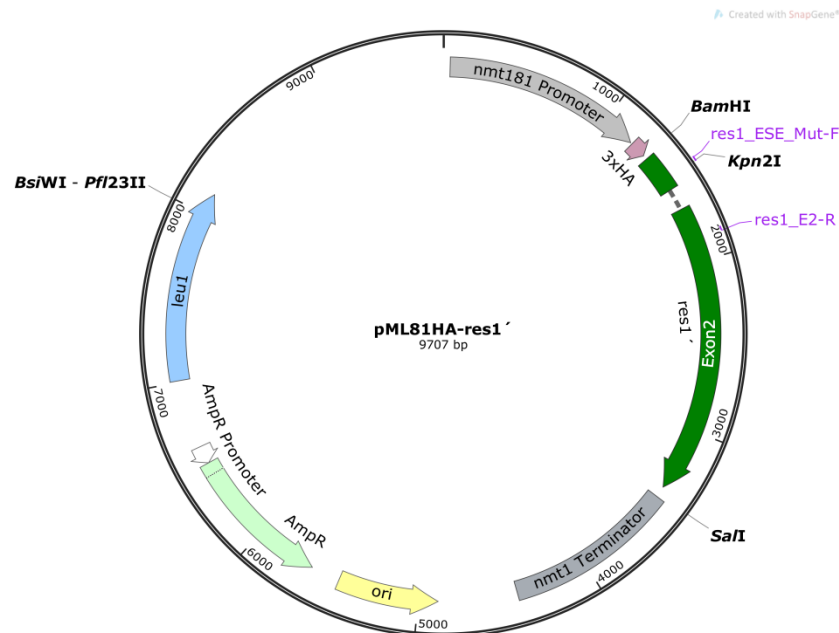


Abbildung 47| Der Integrationsvektor pML81HA-res1'

Vektorkarte des pML81HA-res1'. Das *res1*'-Gen wurde über *Bam*HI und *Sal*I in den Vektor kloniert; *nmt81* Promotor und *nmt1* Terminationssequenz; 3xHA, HA-tag; *AmpR*, Ampicillin-Resistenzgen; *leu1*⁺ aus *S. pombe*.

Zur Unterscheidung zwischen dem *res1*⁺ und dem *res1*' im *leu1*-Lokus wurde der in der RT-PCR verwendete Vorwärts-Primer (*res1_ESE_Mut-F*) so gewählt, dass dieser direkt in dem mutierten Nukleotid endet, das für die Erzeugung der *Kpn21* Schnittstelle genutzt wurde. Die für die Reverse Transkription und anschließenden Amplifikation der Fragmente verwendete *Tth*-Polymerase besitzt keine 3'-5'-Exonukleaseaktivität. Dadurch kann eine Strangverlängerung nur stattfinden, wenn das letzte Nukleotid am 3'-Ende des Primers mit der Sequenz des Templates übereinstimmt. Für die Untersuchung des *res1*⁺ im Originallokus entsprach der Vorwärts-Primer (*res1_ESE_WT-F*) der Wildtyp-Sequenz. Der verwendete Rückwärts-Primer bindet im Exon2 des *res1*-Gens (*res1_E2-R*) und ist für beide Transkripte identisch. Analog wurde mit dem *trs402*'-Gen verfahren. Dort wurde auch der Vorwärts-Primer so gewählt, dass dieser direkt in dem mutierten Nukleotid endet, das für die Erzeugung der *Nco*I Schnittstelle genutzt wurde (*trs402_ESE_Mut-F*).

4 Molekularbiologische Methoden

4.1 Lösungen molekularbiologische Methoden

Alle Lösungen wurden mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ bzw. bei Angabe in Tabelle 16 mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ hergestellt.

Tabelle 16| Lösungen molekularbiologische Methoden

Lösungen	Zusammensetzung
TFBI-Puffer pH 5,8 Autoklavieren Nach dem Autoklavieren wurde 50 mM sterilfiltriertes MnCl_2 dazu gegeben.	10 mM CaCl_2 100 mM RbCl_2 30 mM KOAc 15 % (w/v) Glycerin
TFBI-Puffer pH 6,8 Autoklavieren	10 mM MOPS 10 mM RbCl_2 75 mM CaCl_2 15 % (w/v) Glycerin
STET-Puffer Autoklavieren Nach dem Autoklavieren wurden 0.5 mg/mL Lysozym frisch dazu zugegeben.	8 % (w/v) Saccharose 5 % (v/v) Triton X-100 50 mM Tris-HCl pH 8,0 50 mM EDTA- Na_2 -Salz pH 8,0
LETS-Puffer Der Puffer wurde mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ hergestellt und autoklaviert.	100 mM LiCl 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) 10 mM EDTA 0,2 bzw. 1 % (w/v) LiSD_2
10x TBE	1 M Tris 89 mM Borsäure 20 mM EDTA- Na_2 -Salz

4.2 Herstellung kompetenter Zellen

Die Kompetenz von Bakterien Fremd-DNA aufzunehmen, kann mit Hilfe von Calcium- und Rubidiumchlorid künstlich gesteigert werden. In dieser Arbeit wurde die Rubidiumchlorid-Methode benutzt, um kompetente *E. coli* Zellen herzustellen (Hanahan, 1983). Dazu wurden 500 mL LB-Medium mit dem Antibiotikum des entsprechenden Resistenzgens des Bakteriums mit 5 mL einer *E. coli* über Nacht Kultur angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,4-0,7 bei 37 °C inkubiert. Dann wurden die Zellen durch 10 Min. Zentrifugation bei 4500 Upm und 4 °C geerntet. Das Pellet wurde in 150 mL TFBI-Puffer durch Schwenken der Zentrifugenbecher gelöst und 15 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut durch 10 Min. Zentrifugation bei 4500 UpM und 4 °C pelletiert. Abschließend wurde

das Zellpellet in 20 mL TFBII-Puffer resuspendiert, die Zellen in 400 µL Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

4.3 Transformation in *E. coli*

Die kompetenten *E. coli* Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Dann wurden 200 µL von diesen zu der zu transformierenden DNA gegeben und vorsichtig gemischt. Der Ansatz wurde für 30 Min. auf Eis inkubiert, um die Anlagerung der DNA an die Zellen zu fördern. Anschließend wurde ein Hitzeschock von 2 Min. bei 42 °C durchgeführt, um die Aufnahme der DNA zu ermöglichen. Danach wurden die Zellen sofort auf Eis gestellt, 800 µL LB-Medium dazu gegeben und bei 37 °C für 40 Min. inkubiert. Abschließend wurden die Zellen bei 6000 UpM für eine Min. abzentrifugiert, auf Selektionsmedium ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

4.4 Plasmid-Isolierung aus *E. coli*

Die Plasmid-Isolierung aus *E. coli* erfolgte entweder nach der STET-Methode nach Gaterman et al. (1988) oder es wurde das NucleoSpin® Plasmid Kit von Macherey&Nagel verwendet. Bei Verwendung des Kits wurden die Vorgaben des Herstellers eingehalten, um reine Plasmid-DNA zu isolieren. Die STET-Methode hingegen ist eine schnelle, kostengünstige und dreckige Methode, die zur ersten Identifikation von positiven Kolonien verwendet wurde.

4.4.1 Plasmid Mini-Präparation aus *E. coli* nach Gaterman et al

Es wurden 2 mL LB Medium mit Zellen einer *E. coli* Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die über Nacht Kultur wurde in einem 2 mL Eppendorfgefäß bei 13000 UpM für eine Min. geerntet. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet im restlichen Tropfen des Mediums durch Vortexen resuspendiert. Dann wurden 110 µL STET-Puffer dazu gegeben, durch invertieren vorsichtig gemischt und für 10 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension für 2 Min. bei 100 °C aufgeköcht. Anschließend wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation für 15 Min. bei 13000 UpM pelletiert. Diese wurden dann mit einem sterilen Zahnstocher entfernt und die Plasmid-DNA mit 110 µL Isopropanol, sorgfältigem Vortexen und erneuter Zentrifugation für 15 Min. bei 13000 UpM präzipitiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet mit 400 µL 70 % Ethanol durch 5 Min. Zentrifugation bei 13000 UpM gewaschen. Abschließend wurde der Überstand verworfen, das Pellet in der Speed-Vac getrocknet, in 30 µL H₂O_{bidest.} gelöst und bei -20 °C gelagert.

4.5 Reinigung von DNA

Für die Reinigung von DNA und der Entfernung von Proteinen wurde das DNA Clean & Concentrator™ -5 Kit der Firma Zymo Research nach Vorgaben des Herstellers verwendet.

4.6 Photometrische Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäure-Lösungen wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm mit dem NanoPhotometer® C40 (Implen) bestimmt. Eine Extinktion von 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg/mL doppelsträngiger DNA, 40 µg/mL RNA und 33 µg/mL einzelsträngiger DNA in der Lösung.

4.7 Restriktionsverdau

Ein Restriktionsverdau doppelsträngiger DNA wurde mit Restriktionsenzymen der Firma Thermo Scientific durchgeführt. Die Puffer und Restriktionsbedingungen wurden den Angaben des Herstellers entnommen und nach diesen durchgeführt.

4.8 Ligation

Bei der Ligation werden doppelsträngige DNA-Fragmente durch die T4-DNA Ligase mit Hilfe von ATP, das als Co-Faktor dient, miteinander verknüpft. In einem 20 µl Ansatz wurden 20-100 ng des linearisierten Vektors unter Zugabe von PEG 4000 und 1 U der T4-DNA Ligase (Thermo Scientific) mit dem gewünschten Fragment, im 3- bis 5-fachem molaren Überschuss, miteinander ligiert. Die Ligation erfolgte entweder bei Raumtemperatur für 1-2 Std. oder bei 4 °C über Nacht.

4.9 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Bestimmung der Größe von DNA-Fragmenten durchgeführt. Nukleinsäuren haben negativ geladene Phosphatgruppen wodurch diese in Richtung der positiv geladenen Anode laufen und somit der Größe nach aufgetrennt werden können, sobald ein elektrisches Feld angelegt wird. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in einem TBE-Puffersystem (89 mM Tris, 89 mM Borsäure und 2 mM EDTA) bei 160 V nach Sambrook und Russell (2001) mit 1-2 % Agarosegelen. Die Agarosegele wurden mit 0,1 µg/mL Ethidiumbromid versetzt, das sich an die DNA anlagert und im UV-Licht fluoresziert, wodurch die DNA-Fragmente sichtbar gemacht werden konnten. Vor dem Auftragen der Proben wurden diese mit 6x Ladepuffer (Thermo Scientific) versetzt. Je nach erwarteter Größe wurde entweder der Gene Ruler 50 bp DNA Ladder oder der Gene Ruler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific) als Größenstandard verwendet.

4.10 Extraktion aus Agarose-Gelen

Zur Extraktion von Nukleinsäuren aus Agarose-Gelen wurde das Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit der Firma Zymo Research nach Vorgaben des Herstellers verwendet.

4.11 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde durch die Firma Seqlab durchgeführt. Die Proben wurden nach Vorgaben der Firma vorbereitet.

4.12 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Für die Amplifikation der DNA-Fragmente wurde die Phusion® High-Fidelity Polymerase der Firma New England Biolabs verwendet. Die Polymerase zeichnet sich durch ihre geringe Fehlerrate und eine hohe Geschwindigkeit aus. Mit dieser PCR wurden die Fragmente für die Klonierung in den Vektor pGEX-6P-1 und die Fragmente für das YRC amplifiziert. Es wurden die in Tabelle 14 und in Tabelle 17 gezeigten Primer für die PCR benutzt.

Die Reaktion wurde in einem 50 µL Ansatz durchgeführt bestehend aus H₂O_{bidest.}, 1 x Phusion HF Puffer (New England Biolabs), 200 µM dNTPs (50 µM je dNTP), 500 nM Vorwärts- und Rückwärts-Primer, 3 % DMSO, 1 U Phusion DNA Polymerase (New England Biolabs) und 1 µL der Template DNA (50-250 ng). Das PCR-Programm umfasste eine initiale Denaturierung für 30 Sek. bei 98 °C, gefolgt von 30 Zyklen bestehend aus einer Denaturierung bei 98 °C für 30 Sek., dem Annealing bei der entsprechenden T_m der Primer (Tabelle 14) für 30 Sek. und einer Elongation bei 72 °C für 15-30 Sek./kb. Abschließend erfolgte eine finale Elongation für 10 Min. bei 72 °C.

4.13 *Pfu*-Mutagenese

Mit Hilfe der *Pfu*-Mutagenese wurden in dieser Arbeit Punktmutationen in dem Gen *res1* eingefügt. Dafür wurde das Gen in den Vektor pUC19 kloniert und als Template für die Mutagenese eingesetzt. Als Polymerase wurde die *PfuTurbo* DNA-Polymerase der Firma Agilent Technologies verwendet, die sich durch eine hohe Geschwindigkeit und geringe Fehlerrate auszeichnet.

Die Reaktion wurde in einem 50 µL Ansatz durchgeführt bestehend aus H₂O_{bidest.}, 1 x *Pfu*-Reaktionspuffer (Agilent Technologies), 400 µM dNTPs (100 µM je dNTP), 285 nM Vorwärts- und Rückwärts-Primer, 2,5 U *PfuTurbo* DNA-Polymerase (Agilent Technologies) und 200 ng der Template DNA. Das PCR-Programm umfasste eine initiale Denaturierung von 30 Sek. bei 95 °C, gefolgt von 18 Zyklen bestehend aus einer Denaturierung bei 95 °C für 30 Sek., dem Annealing bei 55 °C für 60 Sek. und einer Elongation bei 68 °C für 60 Sek./kb.

Nach Abschluss der PCR Reaktion wurden die Proben auf Eis gestellt, 1 µL *DpnI* (10U) dazu gegeben und für eine Std. bei 37 °C inkubiert. Das Enzym *DpnI* verdaut ausschließlich methylierte DNA, wodurch der parentale DNA-Strang abgebaut und auf den neu

synthetisierten, mutierten Strang selektioniert wird. Anschließend wurden 10 µL des jeweiligen Ansatzes in kompetente *E. coli* Zellen (XL1Blue oder Dh5α) transformiert. Positive Plasmide, die die gesetzten Mutationen enthalten, wurden nach Isolierung aus *E. coli* Zellen durch eine Restriktionsanalyse identifiziert.

4.14 *In vitro* Mutagenese nach Kunkel (1985)

Die gerichtete *in vitro* Mutagenese nach Kunkel kann benutzt werden, um Punktmutationen, Deletionen und Insertionen zu setzen. Dazu wird ein Vektor benötigt, der sowohl als doppelsträngige, als auch als einzelsträngige DNA vorliegen und isoliert werden kann. In dieser Arbeit wurde die Methode verwendet, um Mutationen im *res1*⁻ bzw. *trs402*⁻-Reporter gen zu setzen.

Zuerst wurde die zu mutierende DNA in den M13mp18 kloniert und in *E. coli* XL1Blue transformiert. Die Transformation erfolgte allerdings etwas abgewandelt als in Abschnitt 4.3 beschrieben. Nach dem Hitzeschock wurde sowohl der komplette Transformationsansatz als auch 200 µL einer wachsenden *E. coli* XL1Blue Kultur in 5 mL auf 42 °C temperierten Soft-Top Agar überführt, gut gemischt und auf M13 Agarplatten gegossen. Nach Erkalten des Soft-Top Agars wurden die Platten über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Phagen-Plaques aus dem Agar ausgestochen und für 5-10 Min. bei RT mit 200 µL einer wachsenden *E. coli* XL1Blue Kultur inkubiert, damit die Phagen aus dem Agar diffundieren und sich an die Bakterien anheften konnten. Anschließend wurde der Ansatz in 5 mL dYT Medium überführt und für 3-4 Std. bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Nach der Inkubation wurden die einzelsträngigen Phagenpartikel von der doppelsträngigen RF Form des M13 Phagen durch Zentrifugation bei 13000 UpM für eine Min. getrennt und befanden sich im Überstand. Dieser konnte anschließend zur Infektion von weiteren *E. coli* Zellen verwendet werden.

Für die Mutagenese wird Uracil-haltige Einzelstrang-DNA (ssUDNA) benötigt. Dafür wurden zunächst 200 µL einer wachsenden *E. coli* CJ236 Kultur mit den Phagen im Verhältnis 5:1 infiziert, 5-10 Min. bei RT inkubiert, anschließend in 5 mL dYT Medium überführt und für 4-5 Std. unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Der *E. coli* Stamm CJ236 trägt Mutationen in den Genen *dut* und *ung*, wodurch gehäuft Uracil in die DNA eingebaut wird. Nach der Inkubation wurden 2 mL des Bakterien-Phagen-Gemisches in ein 2 mL Eppendorfgefäß überführt und die Bakterien bei 6000 UpM für eine Min. pelletiert. Insgesamt wurde dieser Schritt mit 8 mL Bakterien-Phagen-Gemisch durchgeführt. Anschließend wurden 1,8 mL des Phagenüberstandes in ein neues 2 mL Eppendorfgefäß überführt und erneut für 5 Min. bei 13000UpM zentrifugiert, um verbliebene Bakterien abzutrennen. Nach der Zentrifugation wurden 1,4 mL des Phagenüberstandes in ein neues 1,5 mL Eppendorfgefäß überführt. Dieser wurde pro Ansatz mit jeweils 200 µL PEG/NaCl Lösung (20 % (w/v) PEG 8000;

2,5 M NaCl) gut gemischt und für 20 Min. bei RT inkubiert, um die Phagen zu fällen. Darauf folgte eine Zentrifugation für 20 Min. bei 13000 UpM, um die Phagen zu pelletieren. Jedes Phagen-Pellet wurde in 200 µL H₂O_{bidest.} gelöst. Anschließend erfolgte eine Phenol-Chloroform Extraktion. Dafür wurden jeweils zwei gelöste Pellets vereinigt, mit 400 µL PCIA versetzt, der gesamte Ansatz gevortext und für 15 Min. bei 13000 UpM zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues 1,5 mL Eppendorfgefäß überführt und mit 400 µL Chloroform extrahiert, um die Phenolreste zu entfernen. Anschließend wurde die wässrige Phase in ein neues 1,5 mL Eppendorfgefäß überführt und die ssUDNA durch Zugabe von 0,1 Vol. 3M NaAc (pH 5,2) und 2,5 Vol. 96 % EtOH über Nacht bei -20 °C gefällt. Am folgenden Tag wurde die ssUDNA durch Zentrifugation bei 13000 UpM und 4 °C für 20 Min. pelletiert, mit 400 µL 70 % EtOH gewaschen, in der Speed-Vac getrocknet und abschließend in insgesamt 10 µL H₂O_{bidest.} gelöst.

Die M13 Mutagenese besteht aus zwei aufeinanderfolgenden Reaktionen. Zuerst wurde das 5'-phosphorylierte Oligonukleotid, welches die Mutation trägt, mit der ssUDNA hybridisiert. Dies wurde in einem 10 µL Ansatz bestehend aus H₂O_{bidest.}, 1,5 pmol des Oligonukleotids, 1x Annealing-Puffer (20 mM Tris-HCl pH 7,4; 2 mM MgCl₂; 50 mM NaCl) und 20-100 ng der ssUDNA durchgeführt. Dazu wurde der Ansatz von 85 °C langsam auf 10 °C abgekühlt und auf Eis gestellt. Das hybridisierte Oligonukleotid diente nun als Primer für die darauffolgende Synthesereaktion. Dafür wurde zu der abgeschlossenen Annealing Reaktion 1x Synthesepuffer (je 0,5 mM dATP, dCTP, dGTP dTTP; 1 mM ATP; 10 mM Tris-HCl pH 7,4; 5 mM MgCl₂; 2 mM DTT), 1 U T4 DNA Ligase und 1 U T7 DNA Polymerase gegeben. Der Ansatz wurde zuerst für 10 Min. auf Eis inkubiert, anschließend 10 Min. bei RT und abschließend für 30 Min. bei 37 °C. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 70 µL TE Stopp-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA) beendet. Während der Reaktion synthetisiert die T7 DNA Polymerase in 5'-3'-Richtung den Minusstrang und die T4 DNA Ligase schließt anschließend den Einzelstrangbruch, sodass ein doppelsträngiges DNA-Molekül entsteht. Es wurden 5 µL des Mutagenese-Ansatzes in den *E. coli* XL1Blue Stamm, der *dut*⁺ und *ung*⁺ ist, transformiert. Dieser baut den Uracil-haltigen Plusstrang ab, sodass auf den mutierten Minusstrang selektiert werden kann. Nachdem erneut doppelsträngige DNA isoliert wurde, konnten die positiven Plasmide, die die gesetzten Mutationen enthalten, durch eine Restriktionsanalyse identifiziert werden.

4.15 Yeast Recombinational Cloning (YRC)

Das *Yeast Recombinational Cloning* (YRC) wurde in dieser Arbeit benutzt, um verschiedene Genkonstrukte herzustellen (Abbildung 48). Diese Methode wurde von Ma et al. (1987) erfunden und über die letzten Jahre weiterentwickelt und verbessert (Oldenburg et al., 1997; Gibson, 2009). Beim YRC werden ein linearisierter Vektor und DNA Fragmente, die 20-30 nt

lange überlappende Sequenzen an ihren Enden besitzen, *in vivo* in der Bäckerhefe *S. cerevisiae* über homologe Rekombination zusammengebaut.



Abbildung 48| Übersicht der hergestellten Genkonstrukte mit Hilfe des YRC für die RIP und die Mikroskopie

Alle Konstrukte wurden mit Hilfe des YRC hergestellt und mit der Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase amplifiziert. Anschließend wurden diese in *S. pombe* transformiert und über homologe Rekombination in den Originalloкус integriert. (A) Nat^R-HA-usp102, (B) Nat^R-usp103-HA, (C) msl1-HA-Nat^R, (D) Nat^R-HA-Bpb1 und (E) Nat^R-Uaf2-HA. Die hergestellten Stämme wurden für die RIP verwendet. (F) Srp2-mNeonGreen- Nat^R. Der hergestellte Stamm wurde für die Lokalisierung von Srp2 verwendet.

Zuerst wurden die DNA-Einzelfragmente unter Verwendung der Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase der Firma New England Biolabs amplifiziert. Dabei wurden Primer benutzt, die die Überhänge zum angrenzenden Fragment oder zum linearisierten Vektor pRS426 generieren (Tabelle 17). Nach erfolgreicher Amplifikation der Fragmente wurden diese über das DNA Clean & Concentrator™ -5 Kit der Firma Zymo Research gereinigt und angereichert. Anschließend wurden alle Fragmente und der mit *Bam*HI und *Hind*III linearisierte pRS426 Vektor in den für Uracil auxotrophen *S. cerevisiae* Stamm FY834 transformiert.

Für die Transformation wurde zuerst eine 50 mL Vorkultur des *S. cerevisiae* Stamms FY384 in SD+Uracil Flüssigmedium angesetzt und über Nacht bei 30 °C unter Schütteln inkubiert.

Am nächsten Tag wurde diese Kultur in 100 mL SD+Uracil Flüssigmedium so verdünnt, dass eine Konzentration von 5×10^6 Zellen/mL vorlag und diese wurde dann für 4 bis 5 Stunden unter Schütteln bei 30 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen durch eine Zentrifugation bei 3000 UpM für 3 Min. pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 25 mL $H_2O_{bidest.}$ gewaschen, für 3 Min. bei 3000 UpM pelletiert, der Überstand wieder verworfen und anschließend in 1 mL $H_2O_{bidest.}$ resuspendiert. Dann wurden 100 µL der Zellsuspension in ein 1,5 mL Eppendorfgefäß überführt, die Zellen für 1 Min. bei 13000 UpM pelletiert und der Überstand verworfen. Zu den Zellen wurden neben 0,7 µg des linearisierten Vektors pRS426 und 1 bis 2 µg der DNA-Einzelfragmente folgende Lösungen gegeben:

240 µL	PEG 3350, 50 % (w/v)
36 µL	LiAc, 1M
50 µL	ssDNA, 2 mg/mL Lachssperma-DNA
34 µL	DNA + $H_2O_{bidest.}$

Dann wurden die Zellen durch Vortexen in der Lösung resuspendiert und für 40 Min. bei 42 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 30 Sek. bei 13000 UpM pelletiert und der Überstand verworfen. Abschließend wurden die Zellen in 1 mL $H_2O_{bidest.}$ resuspendiert und jeweils 100 µL und 900 µL auf SD-Uracil Platten ausplattiert. Die Inkubation erfolgte für 3 bis 4 Tage bei 30 °C. Der erfolgreiche Zusammenbau der Einzelfragmente wurde durch Kolonie-PCRs überprüft.

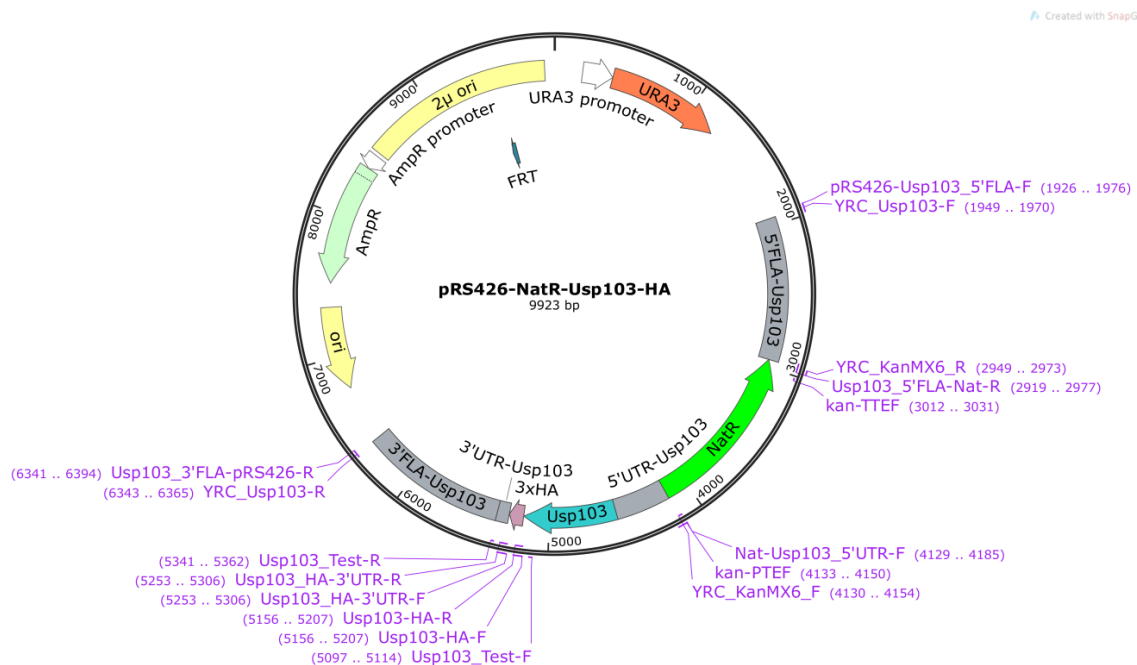


Abbildung 49| Konstruktion des Genkonstrukts pRS426-Nat^R-usp103-HA

Vektorkarte des pRS426, in dem sich das vollständige Nat^R-usp103-HA Konstrukt befindet (mit allen anderen Konstrukten wurde analog verfahren); ori, Replikationsursprung; AmpR, Ampicillin-Resistenzgen; URA3, Gen für Orotidine-5'-phosphate (OMP) Decarboxylase aus *S. cerevisiae*; 2µ ori, 2µ Replikationsursprung in *S. cerevisiae* (behält 20-50 Kopien des 2µ Plasmids, *high copy*); FRT, FRT-Sequenz (*FLP recognition targets* für die FLP Rekombinase aus dem *S. cerevisiae* 2µ Plasmid)

Tabelle 17| Primer zur Amplifikation der Fragmente für das YRC

Oligo	Sequenz 5'-3'
pRS426-Usp102_5'FLA-F	CCAGGGTTTTCCAGTCACGACGACAAGGTAAGTATTTGAATCAAGAC
Usp102_5'FLA-Nat-R	CGATACTAACGCCGCCATCCAGTTTAAACTTACGAATGCTTGAATAGTG
Usp102_Nat-5'UTR-F	GGGGACGAGGCAAGCTAAACAGATCTCTTTTCTGCAACTGAAAACAAG
Usp102_5'UTR-HA-R	CCCGCATAGTCAGGAACATCGTATGGGTACATTGGATGTTAAATATAAAAAG
Usp102_5'UTR-HA-F	CTTTTATATTTTAAACATCCAATGTACCCATACGATGTTCTGACTATGCGGG
HA-Usp102-R	CTTGATGCGAATTGTTTGGAGATCGCACTGAGCAGCGTAATCTGGAACG
HA-Usp102-F	CGTTCAGATTACGCTGCTCAGTGCATCCTCAAACAAATTCGCATCAAG
Usp102-pRS426-R	GCGGATAACAACATGCAGACAGGAAACAGCCTACGAGGCCTTCCGAGCGAATG
Usp102_YRC-F	ACAAGGGTAAGTATTTGAATCAAGAC
Usp102_YRC_end-R	CTACGAGGCCTTCCGAG
Usp102_Test-F	GATTCATCATAACATTAGTGCCG
Usp102_Test-R	GGTGTTTGAGAGTCTGTCTC
pRS426-Usp103_5'FLA-F	CCAGGGTTTTCCAGTCACGACGAGTCGTCTCCAAATGTTTCATCAGATGC
Usp103_5'FLA-Nat-R	CGATACTAACGCCGCCATCCAGTTTAAACATTTATTGAATTTTATTGTCATGCTC
Nat-Usp103_5'UTR-F	GGGGACGAGGCAAGCTAAACAGATCTAACTTATACTCCAAATTACAATTGTTCTCTC
Usp103-HA-R	CCCGCATAGTCAGGAACATCGTATGGGTAAGCACGTACAAACCTTTGATGAC
Usp103-HA-F	GTCATCAAAGGTTTGTACGTGCTTACCCATACGATGTTCTGACTATGCGGG
Usp103_HA-3'UTR-R	CAAGTTTTAATCTTTTAGATGTCATTTTAGCACTGAGCAGCGTAATCTGGAACG
Usp103_HA-3'UTR-F	CGTTCAGATTACGCTGCTCAGTGCTAAAATGACATCTAAAAGATTAAAACCTTG
Usp103_3'FLA-pRS426-R	GCGGATAACAACATGCAGACAGGAAACAGCGACAGAGATTCCCTATCAGCAAGGG
YRC_Usp103-F	AGTCGTCTCCAAATGTTTCATC
YRC_Usp103-R	GACAGAGATTCCTTATCAGCAAG
Usp103_Test-F	GCGTACTCATTGCAATGC
Usp103_Test-R	CCAGTAGTAAACGGTTATAAAC
pRS426-Msl1-F	CCAGGGTTTTCCAGTCACGACGATGAATCAAAATACACTTTATGTG
Msl1-HA-R	CCCGCATAGTCAGGAACATCGTATGGGTACTCAAGGTCAGCTTCATCACGTAG
Msl1-HA-F	CTACGTGATGAAGCTGACCTTGAGTACCCATACGATGTTCTGACTATGCGGG
Msl1_HA-3'UTR-R	GTGAATTTTAGAAAATGTACAGTTTAGCACTGAGCAGCGTAATCTGGAACG
Msl1_HA-3'UTR-F	CGTTCAGATTACGCTGCTCAGTGCTAAACTGTACATTTTCTAAAATTCAC
Msl1_3'UTR-Nat-R	CGATACTAACGCCGCCATCCAGTTTAAACCTGTAAACAAGATGATATTGGAC
Msl1_Nat-3'FLA-F	GGGGACGAGGCAAGCTAAACAGATCTCTATTTTAGTGATTTTTCATGC
Msl1_3'FLA-pRS426-R	GCGGATAACAACATGCAGACAGGAAACAGCGGAATGTTAAGTAAAGTCAAACCTC
Msl1_YRC-F	ATGAATCAAAATACACTTTATGTG
Msl1_YRC_end-R	GGAATGTTAAGTAAAGTCAAAC
Msl1_Test-F	CGTCGCCGAAAATGACAG
Msl1_Test-R	CTCTTGACTCCAACAGGATCC
pRS426-Bpb1_5'FLA-F	CCAGGGTTTTCCAGTCACGACGAAACGATTGAAAACCTTGTTGTATGG
Bpb1_5'FLA-Nat-R	CGATACTAACGCCGCCATCCAGTTTAAACTAAAAGAGAATATTGTAATATTATATTGTAATACC
Bpb1_Nat-5'UTR-F	GGGGACGAGGCAAGCTAAACAGATCTCAATTCCTATTCGCTTAACCTTGATGCTTG
Bpb1_5'UTR-HA-R	CCCGCATAGTCAGGAACATCGTATGGGTACATTTTAATAAGACTGCTAGATCGAAGACGG

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Oligo	Sequenz 5'-3'
Bpb1_5'UTR-HA-F	CCGTCTTCGATCTAGCAGTCTTATTAAAATGTACCCATACGATGTTCTGACTATGCGGG
HA-Bpb1-R	GTAGACCCCTACTGACCTTGAATTCAGGCACTGAGCAGCGTAATCTGGAACG
HA-Bpb1-F	CGTTCCAGATTACGCTGCTCAGTGCTGAATTCAGGTCAGTAGGGTCTAC
Bpb1-pRS426-R	GCGGATAACAACCTGCAGACAGGAAACAGCCTATCGATTGGAATATCCGTTTGGCATTG
YRC-Bpb1-F	AAACGATTGAAAACCTTGTTG
YRC-Bpb1-R	CTATCGATTGGAATATCCGT
Bpb1-Test-F	CTCCTTGCCTCCTACATT
Bpb1-Test-R	AGGGAGTATTATTTCGAACCT
pRS426-Uaf2_5'FLA-F	CCAGGGTTTTCCAGTCACGACGCAGAAAATCAATCACATATTTACTG
Uaf2_5'FLA-Nat-R	CGATACTAACGCCGCCATCCAGTTTAAACCCTTAAATCAGATACCAAACCTGCGTAGC
Nat-Uaf2_5'UTR-F	GGGACGAGGCAAGCTAAACAGATCTATACGTAGAACTGTGGTGAGTTTTCC
Uaf2-HA-R	CCCGCATAGTCAGGAACATCGTATGGGTAATTTTTGCGTTCAGCAGTTACACTGACCC
Uaf2-HA-F	GGGTCAGTGTAAGTCTGAACGCAAAAATTACCCATACGATGTTCTGACTATGCGGG
Uaf2_HA-3'UTR-R	CCAAAACAAATACATTCCATAAGTTGCTATTTAGCACTGAGCAGCGTAATCTGGAACG
Uaf2_HA-3'UTR-F	CGTTCCAGATTACGCTGCTCAGTGCTAAATAGCAACTTATGGAATGATTTGTTTTGG
Uaf2_3'FLA-pRS426-R	GCGGATAACAACCTGCAGACAGGAAACAGCTCCCTGTTGGTTTCAAGAATGGTACTGATG
YRC-Uaf2-F	CAGAAAATCAATCACATATTTACTGTAGC
YRC-Uaf2-R	TCCCTGTTGGTTTCAAGAATG
Uaf2-Test-F	GGCCTTAAATGCAGCAG
Uaf2-Test-R	CACAACAACTATAGCCAGAG
pRS426-Srp2-F	CCAGGGTTTTCCAGTCACGACGATGTCGGAGACTAGATTGTTTGTGG
Srp2-mNeonGreen-R	CATATTATCTTCTTACCCTTAGAAACCATTCAGCAGCGACCTGTCCTTC
Srp2-mNG-F	GAAGGACAGGTCGCTGCTGAATGGGTTTCTAAGGGTGAAGAAGATAATATG
Srp2_mNG-3'UTR-R	GTTTACCAAAGGAAAAATTTCTATGTTTACTTGTAAGTTTCATCCATACCC
Srp2_mNG-3'UTR-F	GGGTATGGATGAAGTTTACAAGTAAACATAGAAATTTTTCTTTGGTAAAC
Srp2_3'UTR-Nat-R	CGATACTAACGCCGCCATCCAGTTTAAACACATATGCTTTTGTCTCTTAGGC
Srp2_Nat-3'FLA-F	GGGACGAGGCAAGCTAAACAGATCTACATATATGAATTTTGTACTTCATAATG
Srp2_3'FLA-pRS426-R	GCGGATAACAACCTGCAGACAGGAAACAGCACACTTTGCCCAAATGTTCCGTTT
YRC-Srp2-F	ATGTCGGAGACTAGATTGTTTG
YRC-Srp2-R	ACACTTTGCCCAAATGTTCC
Srp2-Test-F	GTAGCGCTGAAGGACAG
Srp2-Test-R	GACCACAGACATATGACAGG
YRC_KanMX6-R	GTTTAAACTGGATGGCGGCGTTAGT
YRC_KanMX6-F	AGATCTGTTTAGCTTGCCCTCGTCCC
kan-TTEF	GTAATATCATGCGTCAATCG
kan-PTEF	ACGAGGCAAGCTAAACAG

4.16 Plasmid-Isolierung aus *S. cerevisiae*

Nach dem YRC wurde die Plasmid-DNA, die das rekombinierte Konstrukt enthält, aus der Hefe isoliert, um das Konstrukt durch Sequenzierung zu überprüfen. Dazu wurden 5 mL SD-Uracil Medium mit der durch Kolonie-PCR überprüften Einzelkolonie angeimpft und über

Nacht unter Schütteln bei 30 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen in ein 2 mL Schraubdeckelröhrchen überführt, durch Zentrifugation bei 13000 UpM für 1 Min. pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 200 µL Lösung I (50 mM Glukose, 25 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA) resuspendiert und mit 0,4 g Glasperlen (0,5 mm Durchmesser) versetzt. Der Zellaufschluss erfolgte zweimal für 20 Sek. mit 5700 m sek⁻¹ im BeadBeater (Precellys24, Peqlab). Anschließend wurden 400 µL Lösung II (200 mM NaOH, 1 % (v/v) SDS) hinzugegeben, durch Invertieren vorsichtig gemischt und für 5 Min. auf Eis inkubiert. Danach wurden 300 µL Lösung III (3 M NaOAc, pH 4,8 oder pH 5,2) hinzugefügt, erneut durch Invertieren vorsichtig gemischt und es erfolgte eine Zentrifugation für 15 Min. bei 13000 UpM und 4 °C, um die Zelltrümmer zu entfernen. Anschließend wurden 500 µL des Überstandes in ein neues 1,5 mL Eppendorfgefäß überführt und die DNA wurde mit 1 mL eiskaltem 96 % Ethanol präzipitiert. Dazu wurde der Ansatz durch Vortexen gut gemischt und für 15 Min. bei 13000 UpM und 4°C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und das DNA-Pellet mit 500 µL 70 % Ethanol und einer Zentrifugation bei 13000 UpM und 4 °C für 5 Min. gewaschen. Abschließend wurde der Überstand verworfen das DNA-Pellet in der SpeedVac getrocknet, in 15 µL RNase versetztem H₂O_{bidest.} gelöst und bei -20 °C weg gefroren.

Für die Transformation durch Elektroporation wurden 50 µL elektro-kompetente Zellen mit der zu transformierenden DNA in eine Elektroporationsküvetten überführt. Die Elektroporation erfolgte bei einer Spannung von 2,5 kV, einem Widerstand von 200 Ω und einer Kapazität von 25 µF. Direkt danach wurde 1 mL LB Medium in die Küvette pipettiert und der gesamte Ansatz in ein 1,5 mL Eppendorfgefäß überführt. Die Zellen wurden für eine Stunde bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 5 Minuten bei 6000 UpM. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen im zurückbleibenden Medium resuspendiert, auf Selektionsmedium ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

5 Biochemische Methoden

5.1 Lösungen biochemische Methoden

Alle Lösungen wurden mit H₂O_{dest.} bzw. bei Angabe in Tabelle 18 mit H₂O_{bidest.} hergestellt.

Tabelle 18| Lösungen biochemische Methoden

Lösungen	Zusammensetzung
1x PBS pH 7,4	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄
Cleavage-Puffer pH 7,5	50 mM Tris-HCl (pH 7,5) 150 mM NaCl 1 mM EDTA
5 x SDS-Probenpuffer β-Mercaptoethanol frisch dazu geben	312,5 mM Tris-HCl (pH 6,8) 4 % (w/v) SDS 0,05 % (w/v) Bromphenolblau 50 % (v/v) Glycerin 500 mM β-Mercaptoethanol
4 x SDS-Sammelgelpuffer pH 6,8	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) 0,4 % (w/v) SDS
4 x SDS-Trenngelpuffer pH 8,8	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) 0,4 % (w/v) SDS
Trenngel 8 % oder 12 %	5,8 mL bzw. 4,2 mL H ₂ O _{bidest.} 3 mL 4 x SDS-Trenngelpuffer 3,2 mL bzw. 4,8 mL 30% Acrylamid 150 µL 10 % (w/v) APS 20 µL TEMED
Sammelgel 5 %	2,9 mL H ₂ O _{bidest.} 1,25 mL 4 x SDS-Sammelgelpuffer 850 µL 30% Acrylamid 62,5 µL 10 % (w/v) APS 15 µL TEMED
1 x Glycinpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Lösungen	Zusammensetzung
Coomassie-Färbelösung	10 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure 0,1 % (w/v) Brilliant Blau R250
Coomassie-Entfärbelösung	10 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure

5.2 Proteinüberexpression

Für die Proteinüberexpression mit GST-getaggtten Proteinen wird IPTG zur Induktion des *tac*-Promotors eingesetzt (de Boer et al., 1983). Dazu wurde 1 L mit Ampicillin versetztem LB-Medium mit der entsprechenden *E. coli* BI21 über Nacht Kultur auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft. Diese Kultur wurde bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,7 bei 37 °C inkubiert. Nach Erreichen der OD₆₀₀ wurde die Kultur mit 1 mM IPTG induziert und für 2 Std. bei 37 inkubiert. Anschließend erfolgte eine erneute Induktion mit 1 mM IPTG und einer Inkubation für 2 Std. bei 37 °C. Dann wurden die Zellen durch 10 Min. Zentrifugation bei 6000 UpM und 4°C geerntet. Das Pellet wurde in 30 mL PBS und 1 mM DTT durch Schwenken der Zentrifugenbecher gelöst und in ein 50 mL Falcon überführt. Abschließend wurden die Zellen erneut durch 15 Min. Zentrifugation bei 4000 UpM pelletiert, der Überstand verworfen, das Zellpellet in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

5.3 Proteinaufreinigung über den GST-Tag

Die Aufreinigung der Proteine erfolgte nach den Vorgaben für die Glutathion-Sepharose 4B von GE Healthcare. Das Zellpellet aus 1 L *E. coli* BI21 Zellkultur wurde in 30 mL PBS mit 1x cOmplete™ EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche), 1,3 mM PMSF, 1,7 mM Benzamidin und 1 mM DTT durch Vortexen gut gelöst. Der Aufschluss erfolgte durch zwei Durchgänge in der Frenchpress bei 16000 Psi. Anschließend wurde für 20 Min. bei 9900 UpM und 4 °C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand auf die zuvor equilibrierte Glutathion-Sepharose gegeben. Zur Equilibrierung der Glutathion-Sepharose wurden 1,6 mL der Sepharose mit einer abgeschnittenen Spitze in ein 50 mL Falcon überführt. Dieses wurde auf 30 mL mit PBS und 1mM DTT aufgefüllt und durch Invertieren des Falkons gewaschen. Anschließend wurde die Sepharose für 5 Min. bei 4000 UpM pelletiert und der Überstand verworfen. Nach dem Waschschrift wurde sofort die Proteinsuspension auf die Sepharose gegeben, um eine Austrocknung der Sepharose zu vermeiden. Durch Invertieren wurde die Proteinsuspension gut mit der Sepharose vermischt und der Ansatz für 45 Min. bei 4 °C auf dem Rotationsmischer inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Sepharose für 5 Min. bei 4000 UpM pelletiert. Anschließend folgten insgesamt vier Waschschrte. Dazu wurden 30 mL PBS mit 3 % Triton X-100 und 1 mM DTT auf die

Sepharose gegeben und das Falcon invertiert bis die Sepharose komplett resuspendiert war. Dann wurde der Ansatz für 5 Min. auf dem Rotationsmischer inkubiert und anschließend für 5 Min. bei 4000 UpM zentrifugiert, um die Sepharose wieder zu pelletieren, und der Überstand verworfen. Dieser Waschschrift wurde noch einmal wiederholt. Anschließend wurden 30 mL Tris-HCl (50 mM, pH 7,5) mit 1 mM DTT auf die Sepharose gegeben und wie zuvor verfahren. Der letzte Waschschrift wurde mit dem Cleavage-Puffer und 1 mM DTT durchgeführt. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Sepharose mit 600 µL Cleavage-Puffer und 1mM DTT versetzt und durch hoch und runter Pipettieren mit einer abgeschnittenen Spitze vermischt. Die Suspension wurde in ein 2 mL Eppendorfgefäß überführt, mit 52 µL PreScission Protease (GE Healthcare) versetzt und über Nacht bei 4°C auf dem Rotationsmischer inkubiert. Nach der Inkubation wurde für 5 Min. bei 6000 UpM und 4 °C zentrifugiert und der Überstand mit dem gewünschten Protein in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Dieser wurde dann mit Glycerin zu einer Endkonzentration von 5 % (v/v) versetzt, in 40 µL Aliquots aufgeteilt und mit Hilfe von flüssigem Stickstoff eingefroren. Alle aufgereinigten Proteine wurden bei -80 °C gelagert.

5.4 *In vitro* Kinaseassay

Für das Kinaseassay wurden in einem 20 µL Ansatz das jeweilige mögliche Substrat mit der Kinase, im Verhältnis 2.5 zu 1, 20 mM HEPES-KOH (pH 7.5, 1mM DTT), 50 µM ATP, 1 mM MgCl₂ und 4 µCi γ [³²P] ATP gemischt. Anschließend erfolgte zum Ablauf der Kinase-Reaktion eine Inkubation für 30 Min. bei 30 °C. Die Proben wurden dann mit 5x SDS-Probenpuffer versetzt, für 5 Min. bei 100 °C aufgeköcht, um die Reaktion abzustoppen, und für eine Min. bei 13000 UpM zentrifugiert. Die Ansätze wurden abschließend komplett auf ein SDS-Gel aufgetragen und die Auftrennung erfolgte bei 160 V. Zum Sichtbarmachen der phosphorylierten Substrate wurde dann ein Film für einen Zeitraum von 2 Min. bis zu 16 Std. auf das SDS-Gel aufgelegt, welcher dann entwickelt (Röntgen-Entwicklerlösung, Kodak) und fixiert (Röntgen-Fixierlösung, Kodak) wurde.

5.5 Synthetische Peptidbanken

Dieser Versuch wurde in der Arbeitsgruppe von Lewis C. Cantley des Meyer Cancer Center, Department of Medicine des Weill Cornell Medical College (New York) von Jared L. Johnson durchgeführt. Das Ziel des Versuchs war es, die idealen Substrat-Sequenzen der drei Kinasen Prp4, Dsk1 und Lkh1 aus *S. pombe* zu ermitteln. Dafür wurden die Kinasen Prp4, Dsk1 und Lkh1 in unserem Labor als N-terminale GST-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert und anschließend über den GST-Tag wie zuvor beschrieben mit Hilfe von Glutathion-Sepharose aufgereinigt und für die synthetischen Peptidbanken eingesetzt. Die synthetischen Peptidbanken sind 198 verschiedene biotinylierte Substrat-Peptid-

Mischungen, die jeweils an der zentralen Position 0 ein fixiertes Serin/Threonin enthalten und eine zusätzliche definierte Aminosäure, die an den flankierenden Positionen -5 bis +4 fixiert ist, während die restlichen Positionen degeneriert sind. Die einzelnen Peptidbanken wurden in einer 384-well Platte *in vitro* mit der rekombinanten Kinase und γ [^{32}P] ATP inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf eine mit Avidin/Streptavidin beschichteten Membran, an die die biotinylierten Peptide binden können, überführt und nach mehreren Waschschritten durch einen Phosphorimager sichtbar gemacht (Hutti et al., 2004).

6 Methoden zur Untersuchung von *S. pombe*

6.1 Kreuzung von *S. pombe* Stämmen

Die Voraussetzung für die Kreuzung von zwei *S. pombe* Stämmen ist, dass diese die unterschiedlichen Paarungstypen h^{-S} und h^{+N} besitzen. Für die Kreuzung wurde jeweils eine Impföse des jeweiligen Stammes in 100 μL 0,85 % NaCl gelöst und anschließend miteinander vermischt. Diese Zellsuspension wurde anschließend auf eine SPA Agarplatte getropft und für zwei Tage bei 25 °C inkubiert. Durch den Stickstoffmangel in der SPA Platte können die Zellen unterschiedlichen Paarungstyps miteinander zu einer Zygote verschmelzen. Danach durchlaufen die Zellen die Meiose, wodurch ein Ascus mit vier haploiden Ascosporen entsteht (Gutz et al., 1974). Nachdem diese sogenannten Tetraden dünn auf einer Vollmediumsplatte ausgestrichen und für zwei Std. bei 25 °C inkubiert wurden, können die Sporen mit dem Mikromanipulator (Singer Instruments) ausgelegt und nach mehreren Tagen Inkubation bei 25 °C oder 30 °C auf ihren Genotyp getestet werden.

6.2 Transformation in *S. pombe*

Eine Transformation in *S. pombe* wurde durchgeführt, um Gen-Konstrukte in das Hefegenom zu integrieren. Als erstes wurde eine Vorkultur in EMM Medium (mit den benötigten Zusätzen) angesetzt und unter Schütteln bei 30 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde mit dieser Vorkultur eine Hauptkultur von 100 mL EMM Medium (mit den benötigten Zusätzen) mit einer OD_{600} von etwa 0,04 angesetzt. Diese wurde erneut bei 30 °C über Nacht unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden dann zweimal hintereinander in ein 50 mL Falcon überführt und durch eine Zentrifugation von 3 Min. bei 2000 UpM pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet zweimal mit 20 mL sterilem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gewaschen, indem die Zellen resuspendiert und bei 2000 UpM für 3 Min. erneut pelletiert wurden. Anschließend erfolgte ein weiterer Waschschriff mit 20 mL TE/LiAc (100 mM Lithiumacetat, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA pH 8,0), die Zellen wurden erneut bei 2000 UpM für 3 Min. pelletiert und der Überstand verworfen. Dann wurden die Zellen in 1 mL TE/LiAc aufgenommen und für 15 Min. bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Nach der Inkubation wurden für jeden Transformationsansatz 100 μL der Zellsuspension in ein 1,5 mL

Eppendorfgefäß überführt und 10 µL frisch denaturierte Lachssperma-DNA (10 mg/mL), sowie die zu transformierende DNA hinzugefügt. Für die Transformation zur Integration in das Genom von *S. pombe* wurden 10 µg linearisiertes Plasmid oder PCR-Produkt verwendet. Der Ansatz wurde gut gemischt und für 30 Min. bei 30 °C inkubiert. Danach wurden zu jedem Transformationsansatz 500 µL TE/LiAc/PEG Lösung (100 mM Lithiumacetat, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA pH 8,0, 40 % PEG 4000) gegeben, gut gemischt und für weitere 30 Min. bei 30 °C inkubiert. Dann erfolgte ein Hitzeschock für 20 Min. bei 42 °C. Anschließend wurden die Zellen durch eine Zentrifugation für 5 Min. bei 6000 UpM pelletiert und der Überstand verworfen. Es erfolgte eine weitere Zentrifugation für 1 Min. bei 6000 UpM, um das TE/LiAc/PEG möglichst vollständig zu entfernen. Der Überstand wurde komplett abgenommen und die Zellen in 100 µL sterilem H₂O_{bidest.} gelöst. Abschließend wurden die Zellen auf Selektionsmedium ausplattiert und mehrere Tage bei 30 °C inkubiert. Wenn eine Selektion durch ein Antibiotikum durchgeführt wurde, wurden die Zellen nach dem Resuspendieren in 100 µL sterilem H₂O_{bidest.} in 4 mL YEA Medium überführt und über Nacht bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen dann durch eine Zentrifugation für 15 Sek. bei 13000 UpM in einem 2 mL Eppendorfgefäß pelletiert, in 100 µL sterilem H₂O_{bidest.} gelöst und auf Selektionsmedium mit zugesetztem Antibiotikum ausplattiert.

6.3 Kolonie-PCR *S. pombe*

Die Kolonie-PCR wurde verwendet, um nach der Transformation in *S. pombe* zu überprüfen, ob die Integration in einen bestimmten Gen-Lokus erfolgreich war, ohne genomische DNA isolieren zu müssen. Dazu wurde die DreamTaq DNA Polymerase der Firma Thermo Scientific verwendet. Die Reaktion wurde in einem 12,5 µL Ansatz durchgeführt bestehend aus H₂O_{bidest.}, 1 x DreamTaq Green Puffer (Thermo Scientific), 1 mM dNTPs (250 µM je dNTP), 2 µM Vorwärts- und Rückwärts-Primer und 1,25 U DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Scientific). Als Template DNA wurde ein Teil der zu testenden Hefe-Kolonie mit einer sterilen Pipettenspitze direkt in den Ansatz gegeben und resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch die initiale Denaturierung während des PCR-Programms.

Das PCR-Programm umfasste eine initiale Denaturierung für 5 Min. bei 95 °C, gefolgt von 33 Zyklen bestehend aus einer Denaturierung bei 95 °C für 30 Sek., dem Annealing bei der entsprechenden T_m der Primer für 30 Sek. und einer Elongation bei 72 °C für 1 Min./kb. Abschließend erfolgte eine finale Elongation für 5 Min. bei 72 °C. Nach Abschluss der PCR wurden 5 µL PCR-Ansatz auf ein Agarosegel aufgetragen.

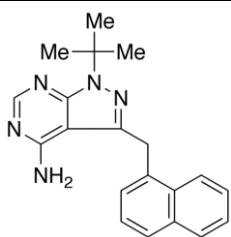
6.4 Isolierung chromosomaler DNA aus *S. pombe*

Für die Isolierung von chromosomaler DNA aus *S. pombe* wurden 4 mL YE Medium mit Hefezellen angeimpft und über Nacht bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden in ein 2 mL Schraubdeckelröhrchen überführt und für eine Min. bei 13000 UpM pelletiert. Dann wurden die Zellen mit 2 mL sterilem H₂O_{bidest.} gewaschen und der Überstand verworfen. Zum Zellpellet wurden dann 400 µL Lysis Puffer (2 % Triton X-100 (v/v), 1 % SDS (w/v), 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM Na₂EDTA), 0,3 g Glasperlen (0,5 mm Durchmesser) und 400 µL PCIA gegeben, um die Zellen zu lysieren. Der Zellaufschluss erfolgte zweimal für 30 Sek. mit 5700 m sek⁻¹ im BeadBeater (Precellys24, Peqlab). Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 15 Min. bei 13000 UpM, die obere wässrige Phase wurde in ein neues 1,5 mL Eppendorfgefäß überführt und erneut mit 400 µL PCIA extrahiert und für 15 min bei 13000 UpM. zentrifugiert. Dann wurde die obere wässrige in ein neues 1,5 mL Eppendorfgefäß überführt und mit 400 µL Chloroform versetzt. Nach starkem Vortexen wurde zentrifugiert und die obere wässrige Phase in ein neues 1,5 mL Eppendorfgefäß überführt. Die Fällung der DNA erfolgte mit 0,7 Vol. Isopropanol und einer Zentrifugation für 20 Min. bei 13000 UpM. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit einem mL 70 % Ethanol durch Zentrifugation für 10 Min. bei 13000 UpM gewaschen. Abschließend wurde der Überstand verworfen, die DNA in der Speed-Vac getrocknet und in 30 µL H₂O_{bidest.} gelöst.

6.5 Der ATP-analoge Inhibitor 1NM-PP1

Der in dieser Arbeit verwendete Inhibitor, zur Inhibition der analog-sensitiven Prp4 Kinase, ist der 1NM-PP1 von der Firma Toronto Research Chemicals (Tabelle 19). Der Inhibitor wurde zu einer Konzentration von 100 mM in DMSO gelöst und anschließend bei -20 °C gelagert.

Tabelle 19| Der Inhibitor 1NM-PP1

Strukturformel	Bezeichnung und CAS-Nummer	Chemischer Name
	<p>1NM-PP1 221244-14-0</p>	<p>4-Amino-1-tert-butyl-3-(1'-naphthylmethyl)pyrazolo [3,4-d]pyrimidine</p>

6.6 RNA Isolierung aus *S. pombe* nach Nischt et al. (1986)

Die Isolierung der Gesamt-RNA wurde nach dem Protokoll von Nischt et al. (1986) durchgeführt. Zuerst wurden ca. 25 mL einer wachsenden *S. pombe* Kultur durch 3 Min. Zentrifugation bei 3000 UpM geerntet. Anschließend wurde das Pellet mit einem mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gewaschen und in ein Schraubdeckelröhrchen überführt. Die Zellen wurden nun für eine Min. bei 13000 UpM pelletiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet bei -20°C eingefroren. Zur Isolierung der RNA wurden zum aufgetauten Pellet 0,3 g Glasperlen (0,5 mm Durchmesser) und 400 μL LETS-Puffer mit 1 % LiSD_2 gegeben und die Zellen dreimal für 30 Sek. mit 5700 m sek^{-1} im BeadBeater (Precellys24, Peqlab) aufgeschlossen. Dann wurden 800 μL PCIA und 400 μL LETS-Puffer (0,2 % LiSD_2) dazugegeben, der gesamte Ansatz gevortext und für 10 Min. bei 13000 UpM und 4°C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues 2 mL Eppendorfgefäß überführt und erneut mit 800 μL PCIA extrahiert und für 10 min bei 13000 UpM. zentrifugiert. Dieser Schritt wurde nochmals wiederholt. Dann wurde die obere wässrige in ein neues 2 mL Eppendorfgefäß überführt und mit 800 μL Chloroform extrahiert, um die Phenolreste zu entfernen. Anschließend wurde die wässrige Phase in ein Corex-Röhrchen überführt und die RNA mit 40 μL 5 M LiCl und 5 mL 96 % Ethanol durch 25 Min. Zentrifugation bei 4°C und 9500 UpM gefällt. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 2,5 mL 70 % Ethanol durch 10 Min. Zentrifugation bei 4°C und 9500 UpM gewaschen. Abschließend wurde das Pellet in der Speed-Vac getrocknet, in 100 bis 300 μL DEPC-Wasser gelöst und bei -20°C eingefroren.

6.7 Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)

Die Reverse Transkriptase PCR wurde durchgeführt, um die Spleißeffizienz ausgewählter Gene untersuchen zu können. Dafür wurde die *Tth*-Polymerase der Firma Roboklon verwendet, die als ein Ein-Schritt System funktioniert. Als Template wurde die Gesamt-RNA, wie unter Absatz 6.6 beschrieben, durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion aus den Hefezellen isoliert.

6.7.1 DNaseI-Verdau

Zuerst wurde ein DNaseI-Verdau durchgeführt, um Verunreinigungen der RNA mit genomischer DNA zu entfernen. Dazu wurden 5 μg RNA in einem 25 μL Ansatz mit 2,5 U RNase-freier DNaseI (RQ1 Promega) für 10 Min. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe des Stopp-Puffers und einer Inkubation von 10 Min. bei 80°C gestoppt. Die RNA wurde direkt in der RT-PCR verwendet.

6.7.2 RT-PCR Bedingungen und Primer

Die hitzestabile *Tth*-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus thermophilus* hat in Anwesenheit von Mangan-Ionen eine Reverse Transkriptase Aktivität und zeitgleich wird die

Aktivität als DNA-Polymerase gehemmt. Ein weiterer Vorteil dieses Enzyms ist, dass der RT Schritt bei 70 °C durchgeführt werden kann, wodurch Sekundärstrukturen der RNA aufgelöst werden. Die verwendeten Primer wurden von der Firma Metabion hergestellt. Diese sind in Tabelle 20 aufgelistet mit der jeweils eingesetzten RNA-Menge, der verwendeten Schmelztemperatur, sowie der Anzahl der Zyklen. Die RT-PCR wird zwar in einem PCR-Gefäß durchgeführt, besteht allerdings aus zwei Schritten, die in unterschiedlichen Puffersystemen stattfinden. Im ersten Schritt findet, in Anwesenheit von Mangan-Ionen, durch die Reverse Transkription die cDNA-Synthese statt. Nachdem die cDNA-Synthese abgeschlossen wurde, wird ein zweiter Mix hinzugegeben, der durch Anwesenheit von Magnesium-Ionen dazu führt, dass die PCR stattfindet und die *Tth*-Polymerase die einzelnen Fragmente amplifiziert.

Die Reverse Transkriptase Reaktion wurde in einem 5 µL Ansatz durchgeführt bestehend, aus H₂O_{bidest.}, 1 x Tth RT Puffer (Roboklon), 1 mM dNTPs (250 µM je dNTP), 1 µM Rückwärts-Primer, 2 mM MnCl₂, 1,25 U *Tth*-Polymerase (Roboklon) und der entsprechenden Menge an Template DNA (0,2 oder 0,6 µg, Tabelle 20). Das RT-Programm umfasste das Annealing des Primers für 3 Min. bei der entsprechenden T_m der Primer (Tabelle 20), gefolgt von der cDNA-Synthese für 25 Min. bei 70 °C.

Anschließend wurden zu jeden Ansatz 20 µL des PCR Ansatzes hinzugegeben und gut gemischt. Dieser bestand aus H₂O_{bidest.}, 1 x Puffer Pol A (Roboklon), 0,8 mM dNTPs (200 µM je dNTP), 1,25 µM Vorwärts-Primer, 1 µM Rückwärts-Primer, 0,75 mM EGTA und 2 mM MgCl₂. Das PCR-Programm umfasste 28-45 Zyklen bestehend aus einer Denaturierung bei 94 °C für 30 Sek., dem Annealing bei der entsprechenden T_m der Primer (Tabelle 20) für 30 Sek. und einer Elongation bei 72 °C für 1 Min./kb.

Tabelle 20| RT-PCR Oligos und Bedingungen

Oligo	Sequenz 5'-3'	RNA [µg]	T _m [°C]	Zyklen
mrp17_E1_F	CTAGGCCAGCTGCAAATG	0,2	55,5	28
mrp17_E2_R	CTGTGGGGTTACTGTAAAAGG			
mrp17_E2_F	GGTGTGGTCGTTGATGTTG	0,2	56	28
mrp17_E3_R	GATAATTGGACAGCTCTGCG			
res1_E1_F	TTCGCTCAAAGGGACTTCATG	0,6	55	45
res1_E2_R	AAGGCCGGGAAAATGACTTTTT			
rpl29_E1_F	ATGGCCAAGTCGAAGAATCATACTA	0,2	53	28
rpl29_E2_R	TTGGTTGCGGCGGAACCTTA			
tbp1_E3_F	ATATTAGGATCCCATTTGTAGGAAGTTGCGATGTTAAATTTCCA	0,2	53	28
tbp1_E4_R	ATATATGAGCTCCTTTTCGCACCAAGTTAAAACAATTTACCA			

6.8 RNA-Sequenzierung

Die RNA-Sequenzierung (RNA-Seq) wurde durchgeführt, um zu untersuchen welchen Einfluss die Abwesenheit der beiden SR Proteine, spSrp1 und spSrp2, auf die Prp4 Kinase Abhängigkeit aller Introns aus *S. pombe* hat. Die RNA-Sequenzierung wurde von José Ayté (Oxidative Stress und Cell Cycle Research Group, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain) vorgenommen. Die bioinformatische Auswertung erfolgte durch Luca Cozzuto (Bioinformatics Core Facility, Centre de Regulació Genòmica (CRG), Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain). Es wurde für jedes Intron, ohne Inhibition der Kinase, sowie 30 und 60 Min. nach Zugabe von 10 μ M 1NM-PP1, die Anzahl der ungespleißten und gespleißten Transkripte bestimmt und der Logarithmus zur Basis 2 für das Verhältnis der beiden Werte berechnet. Der errechnete Wert wird als *Relative Splicing Efficiency Index* (RSEI) bezeichnet. Handelt es sich bei diesem um einen positiven Wert, wurde mehr mRNA als prä-mRNA detektiert und das Intron wird unabhängig von der Prp4 Kinase Aktivität gespleißt. Liegt ein negativer RSEI vor, wurden mehr ungespleißte als gespleißte Transkripte detektiert und das Intron wird abhängig von der Prp4 Kinase Aktivität gespleißt. Für den Versuch wurde der Stamm 1059 verwendet, in dem spSrp1 deletiert ist und spSrp2 unter der Kontrolle des Thiamin-reprimierbaren *nmt81* Promotors Promotors vorliegt. Daher wurde dieser Versuch sowohl ohne als auch mit Zugabe von 200 μ M Thiamin durchgeführt. Die Häufigkeitshistogramme wurden von Frederik Sündermann erstellt.

6.9 RNA-Immunopräzipitation (RIP)

RNA-Immunopräzipitation (RIP) ist eine Methode, um *in vivo* die Bindung von Proteinen an spezifische Bereiche der RNA zu untersuchen. Um eine RNA-Immunopräzipitation durchzuführen wurde eine 50 mL Kultur (insgesamt drei biologische Replikate) angesetzt und diese über Nacht bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 (12,5 x 10⁶ Zellen/mL) wurde die Kultur mit 1,5 % Formaldehyd versetzt, um DNA-Protein und RNA-Protein Interaktionen quervernetzen, und für weitere 20 Min. auf dem Schüttler inkubiert. Die Quervernetzung wurde mit 125 mM Glycin gestoppt und die Zellen, nach einer Inkubation von 5 Min. auf dem Schüttler, durch Zentrifugation für 3 Min. bei 3000 UpM pelletiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Zellpellets mit 25 mL PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation bei 3000 UpM für 3 Min. wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in 1 mL PBS resuspendiert und in ein 2 mL Schraubdeckelröhrchen überführt. Die Zellen wurden nun für eine Min. bei 13000 UpM pelletiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet bei -80 °C eingefroren.

Um mit der RNA-Immunopräzipitation zu starten, wurden die Zellen in 250 μ L *Breaking* Puffer (0,1 M Tris pH 8,0, 20 % Glycerol, 1 mM PMSF und 1 μ L/mL RNasin Plus RNase Inhibitor (Promega, 40 U/ μ L)) aufgetaut, resuspendiert und mit 0,3 g sterilen Glasperlen (0,5 mm Durchmesser) versetzt. Der Zellaufschluss erfolgte dreimal für 30 Sek. mit

5700 m sek⁻¹ im BeadBeater (Precellys24, Peqlab). Nach dem Zellaufschluss wurde zur Entfernung der Glasperlen sowohl der Deckel, als auch der Boden mit einer heißen Nadel punktiert, das Schraubdeckelröhrchen auf ein neues 1,5 mL Eppendorfgefäß gesteckt und für 30 Sek. bei 3000 UpM zentrifugiert. Anschließend wurden 500 µL Lysis Puffer (50 mM HEPES pH7,5 (KOH), 140 mM NaCl₂, 1 mM EDTA, 1 % (v/v) Triton X-100, 0,1 % (w/v) Sodium Deoxycholate und 1 mM PMSF) zu der Zellsuspension hinzugegeben, durch hoch und runter Pipettieren gemischt und für eine Min. bei 13.000 UpM und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 1 mL Lysis Puffer durch hoch und runter Pipettieren gewaschen und erneut für eine Min. bei 13.000 UpM und 4 °C zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurde das Pellet in 250 µL Lysis Puffer resuspendiert und 1 µL RNasin (Promega, 40 U/µL) hinzugegeben. Das Chromatin und die RNA wurde mit Hilfe von Ultraschall (Bioruptor UCD 300, Diagenode) bis zu einer Größe von 250-500 bp geschert (bei 4 °C, *high*, 16 Zyklen 30 Sek. an und 30 Sek. aus). Anschließend erfolgte eine DNaseI Behandlung, um die DNA abzubauen. Dazu wurden zu den 250 µL Probe 15 µL 0,5 M MgCl₂, 15 µL 0,1 M CaCl₂ und 20 µL RNase-freie DNaseI (RQ1 Promega, 1 U/µL) gegeben, leicht gevortext und für 30 Min. bei 37 °C inkubiert. Dann wurden 12 µL 0,5 M EDTA (Endkonzentration: 20 mM) zu jeder Probe gegeben, um die Reaktion abzustoppen. Die gescherte RNA wurde mit 700 µL Lysis Puffer auf 1 mL aufgefüllt, gemischt und für 30 Min. bei 4 °C und 13.000 UpM zentrifugiert. Anschließend wurde genau 1 mL des Überstands, der die gelöste RNA enthält, in ein neues 1,5 mL Eppendorfgefäß überführt.

Bevor mit der eigentlichen Immunopräzipitation begonnen werden konnte, mussten 50 µL (1/20) als Input bei 4 °C aufbewahrt werden. Zu den restlichen 950 µL wurden 20 µL der vorher mit Lysis Puffer gewaschenen Protein A- beziehungsweise Protein G-Sepharose Beads gegeben, sowie 4 µg des primären Antikörpers (Tabelle 21). Die Immunopräzipitation erfolgte auf dem Rotationsmischer über Nacht bei 4 °C.

Tabelle 21| Verwendete Sepharose Beads und Antikörper für die jeweiligen Tags bei der RIP

Tag	Sepharose Beads	Hersteller	Antikörper	Hersteller
HA	Protein G Sepharose™ 4 Fast Flow	GE Healthcare	16B12	Covance Katalognr.: MMS-101R
TAP	IgG- Sepharose 6 Fast Flow	GE Healthcare	-	-
TAP (nur Protein A)	IgG- Sepharose 6 Fast Flow	GE Healthcare	IgG	Sigma-Aldrich Katalognr.: I5381-1MG
Myc	Protein G Sepharose™ 4 Fast Flow	GE Healthcare	9E10	Covance Katalognr.: MMS-150R

Nach der Inkubation wurden die Beads durch Zentrifugation für eine Min. bei 3000 UpM pelletiert und der Überstand verworfen. Danach folgte ein Waschschriff mit 1 mL kaltem Lysis Puffer (mit 140 mM NaCl₂) und anschließend zweimal mit 1 mL kaltem Lysis Puffer (mit 500 mM NaCl₂). Darauf folgten zwei weitere Waschschriffe mit je 1 mL kaltem ChIP Waschpuffer (10 mM Tris-HCl pH8, 250 mM LiCl, 0,5 % (v/v) NP-40, 1 mM EDTA, 0,5 % (w/v) Sodium Deoxycholate, 1 mM PMSF). Zuletzt wurden die Sepharose Beads mit 1 mL TE (10 mM Tris-HCl pH7,5, 1 mM EDTA pH8,0) gewaschen. Alle Waschschriffe erfolgten für 5 Min. bei Raumtemperatur auf dem Rotationsmischer und anschließender Zentrifugation für eine Min. bei 3000 UpM. Nach dem letzten Waschschriff wurden die Beads durch eine Zentrifugation für eine Min. bei 6000 UpM pelletiert und der Überstand verworfen. Die Elution der immunopräzipitierten Proteine und der daran gebundenen RNA von den Beads erfolgte, indem 100 µL Elutions Puffer (50 mM Tris-HCl pH7,5, 10 mM EDTA pH8,0, 0,1 % (v/v) SDS) auf die Beads gegeben und diese für 20 Min. bei 65 °C inkubiert wurden. Anschließend wurden die Beads für eine Min. bei 13.000 UpM zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 mL Eppendorfgefäß überführt. Nun wurden die Beads mit 150 µL TE/0.67 % (v/v) SDS und 1 µL/mL RNasin (Promega, 40 U/µL) versetzt, erneut zentrifugiert und dieser Überstand mit dem ersten eluierten Überstand vereinigt. Zu den 50 µL der Input-Proben wurden ebenfalls 150 µL TE/0.67 % (v/v) SDS und 1 µL/mL RNasin (Promega, 40 U/µL) gegeben. Sowohl die Input-Proben als auch die immunopräzipitierten Proben wurden über Nacht bei 65 °C inkubiert, um die Quervernetzung aufzuheben.

Nach der Inkubation wurden die Proben mit 250 µL TE, 0,04 µg/µL Glykogen (Peqlab), 0,3 µg/µL Proteinase K (Peqlab) und 1 µL RNasin (Promega, 40 U/µL) gemischt und für 2 Std. bei 37 °C inkubiert, um die Proteine zu verdauen. Zur Reinigung und Extraktion der RNA wurden die Proben mit 125 mM NaCl₂ versetzt und zweimal mit 400 µL Phenol/Chloroform extrahiert. Abschließend wurde noch einmal mit 400 µL Chloroform extrahiert. Die Fällung der RNA erfolgte durch Zugabe von 1 mL 96 % Ethanol bei -20 °C über Nacht. Nach der Fällung wurde die RNA durch eine Zentrifugation für 30 Min. bei 4 °C und 13.000 UpM pelletiert, der Überstand verworfen, das Pellet getrocknet und abschließend in 100 µL DEPC-Wasser gelöst. Die gelöste RNA konnte nun in einer RT-qPCR (Reverse Transkriptase quantitative PCR) verwendet werden.

6.10 RT-qPCR

Vor der Verwendung der isolierten RNA, musste ein zusätzlicher DNaseI-Verdau durchgeführt werden, um mögliche Reste von DNA abzubauen. Dazu wurden 8 µL der IP-Probe mit 1 µL RNase-freier DNaseI (RQ1 Promega, 1U/µL) behandelt und für 10 Min. bei 37 °C inkubiert. Die Input-Proben wurden zuvor 1:10 verdünnt und dann sowohl unverdünnt, als auch 1:10 und 1:100 verdünnt im DNaseI-Verdau eingesetzt. Anschließend wurde die

Reaktion durch Zugabe des Stopp-Puffers und einer Inkubation von 10 Min. bei 80 °C gestoppt. Die RNA wurde direkt in der RT-qPCR verwendet.

Die RT-qPCR wurde mit dem GoTaq® 1-Step RT-qPCR System von Promega (A6020) in einem 12,5 µL Ansatz durchgeführt. Der Ansatz bestand aus Nuklease-freiem Wasser (Promega), 1 x GoTaq® qPCR Master Mix (Promega), 1 x GoScript™ RT Mix (Promega), 300 nM Vorwärts- und Rückwärts-Primer (Tabelle 22) und 2 µL der zuvor DNaseI-behandelten IP- oder 1:10 verdünnten Input-Proben (Für die Bestimmung der Primereffizienz wurde die Input-Probe unverdünnt, 1:10 und 1:100 verdünnt eingesetzt). Das RT-qPCR-Programm umfasste eine Reverse Transkription (RT) für 15 Min. bei 37 °C, gefolgt von einer RT Inaktivierung und *Hot-Start* Aktivierung für 10 Min. bei 95 °C. Anschließend erfolgten 40 Zyklen bestehend aus einer Denaturierung bei 95 °C für 10 Sek., dem Annealing bei 60 °C für 30 Sek. und einer Elongation bei 72 °C für 30 Sek. mit anschließender Datenerfassung nach jedem Zyklus. Abschließend erfolgte eine Schmelzkurven-Erfassung von 65 °C bis 95 °C in 0,5 °C Schritten für 5 Sek. mit anschließender Datenerfassung. Ein Teil der Daten sind in Zusammenarbeit mit Daniela Eckert entstanden.

Tabelle 22| RT-qPCR Oligos und Bedingungen

Oligo	Sequenz 5‘-3‘	Bereich	Produktgröße	Intron
prs5_E1-I-F	GATATAGGCCGGGTGAACTTTC	Intron vorne	100 bp	422 nt
prs5_E1-I-R	GATTTATAGGCAACTCCAACCCCTC			
prs5_I-E2-F	GGCAGCATCATCTTTGAATGCA	Intron hinten	115 bp	
prs5_I-E2-R	GCCATTGCTGCAATAAATACACG			
srp54_E1-I-F	GCGTCGTTTGAAGCTCTGCG	Intron vorne	105 bp	480 nt
srp54_E1-I-R	GGCTCACTCTCCGTATGAGAAC			
srp54_I-E2-F	CCCAATGTTCTGTTTTGATTAGGATATCTATCG	Intron hinten	103 bp	
srp54_I-E2-R	GCCGTACATATATTTTTCAGCAGAGTATCG			
dbp2_E2-I2-F	GGTTGCTACTGATGTTGCTTCTAG	Intron vorne	106 bp	699 nt
dbp2_E2-I2-R	GAGAACGCCGGTGAAAGTATAACG			
dbp2_I2-E3-F	GTCAAAACCCTCTTGGGCATTAC	Intron hinten	99 bp	
dbp2_I2-E3-R	GAACGTAGTCTTCCGTATTTCCAGG			
his5-F	GGCTGGAGCTTACGACTTTACTC	Intronlos	104 bp	-
his5-R	ATAGCCTGCTTGAATGCAATACC			

6.11 Fluoreszenzmikroskopie

In *S. pombe* wurden die Zellkerne und Septen durch die Fluoreszenzfarbstoffe DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) und Calcofluor white angefärbt, um diese fluoreszenzmikroskopisch betrachten zu können. Dabei bindet DAPI hauptsächlich an doppelsträngige DNA, wodurch die Zellkerne bei Anregung mit ultraviolettem Licht blau angefärbt zu sehen sind. Calcofluor white hingegen ist ein nicht-spezifisches Fluorochrom, das an Cellulose und Chitin bindet, was in Zellmembranen und Septen zu finden ist. Für die Anfärbung der Zellen mit DAPI und Calcofluor white wurden 300 µL einer *S. pombe* Hauptkultur entnommen, einmal mit 100 µL PBS gewaschen und anschließend in 100 µL PBS resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurden anschließend 10 µL auf einen Objektträger überführt. Dann wurde sowohl 1 µL DAPI (10 µg/mL in PBS), als auch 1 µL Calcofluor white (1 mg/mL in PBS) auf die Zellen gegeben und nach 2 bis 3 Min. mit dem Mikroskop untersucht. Dazu wurde das Inverse Mikroskop Axio Observer Z1 der Firma Zeiss verwendet, welches ein Objektiv mit 100-facher Vergrößerung besitzt. Für die Aufnahmen wurde eine pco.edge Gold sCMOS Kamera verwendet, die durch eine Software bedient wurde, welche von der AG Schnabel (TU Braunschweig) entwickelt worden ist.

V Referenzen

- Änkö, M.L., Müller-McNicoll, M., Brandl, H., Curk, T., Gorup, C., Henry, I., Ule, J., und Neugebauer, K.M.** (2012). The RNA-binding landscapes of two SR proteins reveal unique functions and binding to diverse RNA classes. *Genome Biol* **13**, R17.
- Alahari, S.K., Schmidt, H., und Käufer, N.F.** (1993). The fission yeast *prp4+* gene involved in pre-mRNA splicing codes for a predicted serine/threonine kinase and is essential for growth. *Nucleic Acids Res* **21**, 4079-4083.
- Andrée, N., Eckert, D., und Käufer, N.F.** (2016). Prp4 kinase as part of a safeguarding mechanism during intron recognition in fungi. *Endocytobiosis and Cell Research* **27**, 27-38.
- Andrée-Busch, N., Eckert, D., Zock-Emmenthal, S., und Käufer, N.F.** (2018). Safeguarding of pre-mRNA splicing by Prp4 kinase is based on formation of transient structures. *Trends in Cell & Molecular Biology* **13**.
- Anthony, K.C., und Pomeranz Krummel, D.A.** (2013). Spliceosome. (In ed. John Wiley and Sons (ed.), eLS Ltd).
- Aranda, S., Laguna, A., und de la Luna, S.** (2011). DYRK family of protein kinases: evolutionary relationships, biochemical properties, and functional roles. *Faseb j* **25**, 449-462.
- Aravind, L., Watanabe, H., Lipman, D.J., und Koonin, E.V.** (2000). Lineage-specific loss and divergence of functionally linked genes in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11319-11324.
- Ast, G.** (2004). How did alternative splicing evolve? *Nat Rev Genet* **5**, 773-782.
- Barta, A., Kalyna, M., und Reddy, A.S.** (2010). Implementing a rational and consistent nomenclature for serine/arginine-rich protein splicing factors (SR proteins) in plants. *Plant Cell* **22**, 2926-2929.
- Basi, G., Schmid, E., und Maundrell, K.** (1993). TATA box mutations in the *Schizosaccharomyces pombe* *nmt1* promoter affect transcription efficiency but not the transcription start point or thiamine repressibility. *Gene* **123**, 131-136.
- Berget, S.M.** (1995). Exon recognition in vertebrate splicing. *J Biol Chem* **270**, 2411-2414.
- Berget, S.M., Moore, C., und Sharp, P.A.** (1977). Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 3171-3175.
- Berglund, J.A., Abovich, N., und Rosbash, M.** (1998). A cooperative interaction between U2AF65 and mBBP/SF1 facilitates branchpoint region recognition. *Genes Dev* **12**, 858-867.
- Berglund, J.A., Chua, K., Abovich, N., Reed, R., und Rosbash, M.** (1997). The splicing factor BBP interacts specifically with the pre-mRNA branchpoint sequence UACUAAC. *Cell* **89**, 781-787.
- Bian, Y., Song, C., Cheng, K., Dong, M., Wang, F., Huang, J., Sun, D., Wang, L., Ye, M., und Zou, H.** (2014). An enzyme assisted RP-RPLC approach for in-depth analysis of human liver phosphoproteome. *J Proteomics* **96**, 253-262.
- Bitton, D.A., Atkinson, S.R., Rallis, C., Smith, G.C., Ellis, D.A., Chen, Y.Y., Malecki, M., Codlin, S., Lemay, J.F., Cotobal, C., Bachand, F., Marguerat, S., Mata, J., und Bahler, J.** (2015). Widespread exon skipping triggers degradation by nuclear RNA surveillance in fission yeast. *Genome Res* **25**, 884-896.
- Blencowe, B.J.** (2000). Exonic splicing enhancers: mechanism of action, diversity and role in human genetic diseases. *Trends Biochem Sci* **25**, 106-110.
- Bon, E., Casaregola, S., Blandin, G., Llorente, B., Neuveglise, C., Munsterkötter, M., Guldener, U., Mewes, H.W., Van Helden, J., Dujon, B., und Gaillardin, C.** (2003). Molecular evolution of eukaryotic genomes: hemiascomycetous yeast spliceosomal introns. *Nucleic Acids Res* **31**, 1121-1135.

- Bottner, C.A., Schmidt, H., Vogel, S., Michele, M., und Käufer, N.F.** (2005). Multiple genetic and biochemical interactions of Brr2, Prp8, Prp31, Prp1 and Prp4 kinase suggest a function in the control of the activation of spliceosomes in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Genet* **48**, 151-161.
- Bradley, T., Cook, M.E., und Blanchette, M.** (2015). SR proteins control a complex network of RNA-processing events. *Rna* **21**, 75-92.
- Braunschweig, U., Gueroussov, S., Plocik, A.M., Graveley, B.R., und Blencowe, B.J.** (2013). Dynamic integration of splicing within gene regulatory pathways. *Cell* **152**, 1252-1269.
- Brody, E., und Abelson, J.** (1985). The "spliceosome": yeast pre-messenger RNA associates with a 40S complex in a splicing-dependent reaction. *Science* **228**, 963-967.
- Buratti, E., und Baralle, F.E.** (2004). Influence of RNA secondary structure on the pre-mRNA splicing process. *Mol Cell Biol* **24**, 10505-10514.
- Buratti, E., Muro, A.F., Giombi, M., Gherbassi, D., Iaconcig, A., und Baralle, F.E.** (2004). RNA folding affects the recruitment of SR proteins by mouse and human polypurinic enhancer elements in the fibronectin EDA exon. *Mol Cell Biol* **24**, 1387-1400.
- Burge, C.B., Tuschl, T., und Sharp, P.A.** (1999). Splicing of precursors to mRNAs by the spliceosomes. *The RNA World, Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Busch, A., und Hertel, K.J.** (2012). Evolution of SR protein and hnRNP splicing regulatory factors. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **3**, 1-12.
- Cao, W., und Garcia-Blanco, M.A.** (1998). A serine/arginine-rich domain in the human U1 70k protein is necessary and sufficient for ASF/SF2 binding. *J Biol Chem* **273**, 20629-20635.
- Carnahan, R.H., Feoktistova, A., Ren, L., Niessen, S., Yates, J.R., und Gould, K.L.** (2005). Dim1p is required for efficient splicing and export of mRNA encoding lid1p, a component of the fission yeast anaphase-promoting complex. *Eukaryot Cell* **4**, 577-587.
- Carpy, A., Krug, K., Graf, S., Koch, A., Popic, S., Hauf, S., und Macek, B.** (2014). Absolute proteome and phosphoproteome dynamics during the cell cycle of *Schizosaccharomyces pombe* (Fission Yeast). *Mol Cell Proteomics* **13**, 1925-1936.
- Cartegni, L., Chew, S.L., und Krainer, A.R.** (2002). Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* **3**, 285-298.
- Cavalier-Smith, T.** (1985). Selfish DNA and the origin of introns. *Nature* **315**, 283-284.
- Cavalier-Smith, T.** (1987). The origin of eukaryotic and archaebacterial cells. *Ann N Y Acad Sci* **503**, 17-54.
- Chen, Y.I., Moore, R.E., Ge, H.Y., Young, M.K., Lee, T.D., und Stevens, S.W.** (2007). Proteomic analysis of in vivo-assembled pre-mRNA splicing complexes expands the catalog of participating factors. *Nucleic Acids Res* **35**, 3928-3944.
- Cho, S., Hoang, A., Sinha, R., Zhong, X.Y., Fu, X.D., Krainer, A.R., und Ghosh, G.** (2011). Interaction between the RNA binding domains of Ser-Arg splicing factor 1 and U1-70K snRNP protein determines early spliceosome assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 8233-8238.
- Chow, L.T., Gelinas, R.E., Broker, T.R., und Roberts, R.J.** (1977). An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell* **12**, 1-8.
- Cipak, L., Zhang, C., Kovacikova, I., Rumpf, C., Miadokova, E., Shokat, K.M., und Gegan, J.** (2011). Generation of a set of conditional analog-sensitive alleles of essential protein kinases in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Cycle* **10**, 3527-3532.
- Cléry, A., und Allain, F.H.-T.** (2012). From Structure to Function of RNA Binding Domains. (Madame Curie Bioscience Database. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-2013.).
- Collins, L., und Penny, D.** (2006). Proceedings of the SMCB Tri-National Young Investigators' Workshop 2005. Investigating the intron recognition mechanism in eukaryotes. *Mol Biol Evol* **23**, 901-910.

- Colwill, K., Pawson, T., Andrews, B., Prasad, J., Manley, J.L., Bell, J.C., und Duncan, P.I.** (1996a). The Clk/Sty protein kinase phosphorylates SR splicing factors and regulates their intranuclear distribution. *Embo j* **15**, 265-275.
- Colwill, K., Feng, L.L., Yeakley, J.M., Gish, G.D., Caceres, J.F., Pawson, T., und Fu, X.D.** (1996b). SRPK1 and Clk/Sty protein kinases show distinct substrate specificities for serine/arginine-rich splicing factors. *J Biol Chem* **271**, 24569-24575.
- Cordin, O., und Beggs, J.D.** (2013). RNA helicases in splicing. *RNA Biol* **10**, 83-95.
- Crooks, G.E., Hon, G., Chandonia, J.M., und Brenner, S.E.** (2004). WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res* **14**, 1188-1190.
- de Boer, H.A., Comstock, L.J., und Vasser, M.** (1983). The tac promoter: a functional hybrid derived from the trp and lac promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 21-25.
- De Conti, L., Baralle, M., und Buratti, E.** (2013). Exon and intron definition in pre-mRNA splicing. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **4**, 49-60.
- Deckert, J., Hartmuth, K., Boehringer, D., Behzadnia, N., Will, C.L., Kastner, B., Stark, H., Urlaub, H., und Lührmann, R.** (2006). Protein composition and electron microscopy structure of affinity-purified human spliceosomal B complexes isolated under physiological conditions. *Mol Cell Biol* **26**, 5528-5543.
- Deshler, J.O., und Rossi, J.J.** (1991). Unexpected point mutations activate cryptic 3' splice sites by perturbing a natural secondary structure within a yeast intron. *Genes Dev* **5**, 1252-1263.
- Drabenstot, S.D., Kupfer, D.M., White, J.D., Dyer, D.W., Roe, B.A., Buchanan, K.L., und Murphy, J.W.** (2003). FELINES: a utility for extracting and examining EST-defined introns and exons. *Nucleic Acids Res* **31**, e141.
- Eckert, D.** (2015). Die Serin/Threonin Kinase Prp4 aus *Schizosaccharomyces pombe* verbessert die Erkennung von Introns mit schwachen Spleißstellen (Technische Universität Braunschweig).
- Eckert, D., André, N., Razanau, A., Zock-Emmenthal, S., Lützelberger, M., Plath, S., Schmidt, H., Guerra-Moreno, A., Cozzuto, L., Ayté, J., und Käufer, N.F.** (2016). Prp4 Kinase Grants the License to Splice: Control of Weak Splice Sites during Spliceosome Activation. *PLoS Genetics* **12**, e1005768.
- Egel, R.** (1971). Physiological aspects of conjugation in fission yeast. *Planta* **98**, 89-96.
- Erkelenz, S., Mueller, W.F., Evans, M.S., Busch, A., Schoneweis, K., Hertel, K.J., und Schaal, H.** (2013). Position-dependent splicing activation and repression by SR and hnRNP proteins rely on common mechanisms. *Rna* **19**, 96-102.
- Fabrizio, P., Dannenberg, J., Dube, P., Kastner, B., Stark, H., Urlaub, H., und Lührmann, R.** (2009). The evolutionarily conserved core design of the catalytic activation step of the yeast spliceosome. *Mol Cell* **36**, 593-608.
- Forsburg, S.L.** (2005). The yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*: models for cell biology research. *Gravit Space Biol Bull* **18**, 3-9.
- Fu, X.D., und Ares, M., Jr.** (2014). Context-dependent control of alternative splicing by RNA-binding proteins. *Nat Rev Genet* **15**, 689-701.
- Gao, K., Masuda, A., Matsuura, T., und Ohno, K.** (2008). Human branch point consensus sequence is yUnAy. *Nucleic Acids Res* **36**, 2257-2267.
- Gateman, K.B., Rosenberg, G.H., und Käufer, N.F.** (1988). Double-stranded sequencing, using mini-prep plasmids, in eleven hours. *Biotechniques* **6**, 951-952.
- Giannakouros, T., Nikolakaki, E., Mylonis, I., und Georgatsou, E.** (2011). Serine-arginine protein kinases: a small protein kinase family with a large cellular presence. *Febs j* **278**, 570-586.
- Gibson, D.G.** (2009). Synthesis of DNA fragments in yeast by one-step assembly of overlapping oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* **37**, 6984-6990.
- Gilbert, C., und Svejstrup, J.Q.** (2006). RNA immunoprecipitation for determining RNA-protein associations in vivo. *Curr Protoc Mol Biol* **Chapter 27**, Unit 27.24.
- Gilbert, W.** (1978). Why genes in pieces? *Nature* **271**, 501.
- Gilbert, W.** (1987). The exon theory of genes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **52**, 901-905.

- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., und Oliver, S.G.** (1996). Life with 6000 genes. *Science* **274**, 546, 563-547.
- Goguel, V., Wang, Y., und Rosbash, M.** (1993). Short artificial hairpins sequester splicing signals and inhibit yeast pre-mRNA splicing. *Mol Cell Biol* **13**, 6841-6848.
- Gottschalk, A., Neubauer, G., Banroques, J., Mann, M., Lührmann, R., und Fabrizio, P.** (1999). Identification by mass spectrometry and functional analysis of novel proteins of the yeast [U4/U6.U5] tri-snRNP. *Embo j* **18**, 4535-4548.
- Graveley, B.R.** (2000). Sorting out the complexity of SR protein functions. *Rna* **6**, 1197-1211.
- Gross, T., Richert, K., Mierke, C., Lützelberger, M., und Käufer, N.F.** (1998). Identification and characterization of *srp1*, a gene of fission yeast encoding a RNA binding domain and a RS domain typical of SR splicing factors. *Nucleic Acids Res* **26**, 505-511.
- Gross, T., Lützelberger, M., Weigmann, H., Klingenhoff, A., Shenoy, S., und Käufer, N.F.** (1997). Functional analysis of the fission yeast Prp4 protein kinase involved in pre-mRNA splicing and isolation of a putative mammalian homologue. *Nucleic Acids Res* **25**, 1028-1035.
- Grützmann, K., Szafranski, K., Pohl, M., Voigt, K., Petzold, A., und Schuster, S.** (2014). Fungal alternative splicing is associated with multicellular complexity and virulence: a genome-wide multi-species study. *DNA Res* **21**, 27-39.
- Gutz, H., Heslot, H., und Leupold, U.N.L.** (1974). *Schizosaccharomyces pombe*. In King RC (ed) Handbook of Genetics, pp. 395-446.
- Görnemann, J., Kotovic, K.M., Hujer, K., und Neugebauer, K.M.** (2005). Cotranscriptional spliceosome assembly occurs in a stepwise fashion and requires the cap binding complex. *Mol Cell* **19**, 53-63.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.
- Hedges, S.B.** (2002). The origin and evolution of model organisms. *Nat Rev Genet* **3**, 838-849.
- Heppert, J.K., Dickinson, D.J., Pani, A.M., Higgins, C.D., Steward, A., Ahringer, J., Kuhn, J.R., und Goldstein, B.** (2016). Comparative assessment of fluorescent proteins for in vivo imaging in an animal model system. *Mol Biol Cell* **27**, 3385-3394.
- Hostettler, L., Grundy, L., Kaser-Pebernard, S., Wicky, C., Schafer, W.R., und Glauser, D.A.** (2017). The Bright Fluorescent Protein mNeonGreen Facilitates Protein Expression Analysis In Vivo. *G3 (Bethesda)* **7**, 607-615.
- Hutti, J.E., Jarrell, E.T., Chang, J.D., Abbott, D.W., Storz, P., Toker, A., Cantley, L.C., und Turk, B.E.** (2004). A rapid method for determining protein kinase phosphorylation specificity. *Nat Methods* **1**, 27-29.
- Irimia, M., und Roy, S.W.** (2008). Evolutionary convergence on highly-conserved 3' intron structures in intron-poor eukaryotes and insights into the ancestral eukaryotic genome. *PLoS Genet* **4**, e1000148.
- Irimia, M., und Blencowe, B.J.** (2012). Alternative splicing: decoding an expansive regulatory layer. *Curr Opin Cell Biol* **24**, 323-332.
- Irimia, M., und Roy, S.W.** (2014). Origin of spliceosomal introns and alternative splicing. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **6**.
- Irimia, M., Penny, D., und Roy, S.W.** (2007). Coevolution of genomic intron number and splice sites. *Trends Genet* **23**, 321-325.
- Irimia, M., Roy, S.W., Neafsey, D.E., Abril, J.F., Garcia-Fernandez, J., und Koonin, E.V.** (2009). Complex selection on 5' splice sites in intron-rich organisms. *Genome Res* **19**, 2021-2027.
- Jeong, S.** (2017). SR Proteins: Binders, Regulators, and Connectors of RNA. *Mol Cells* **40**, 1-9.
- Julien, P., Minana, B., Baeza-Centurion, P., Valcarcel, J., und Lehner, B.** (2016). The complete local genotype-phenotype landscape for the alternative splicing of a human exon. *Nat Commun* **7**, 11558.

- Jurica, M.S., und Moore, M.J.** (2003). Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins. *Mol Cell* **12**, 5-14.
- Kataoka, N., Bachorik, J.L., und Dreyfuss, G.** (1999). Transportin-SR, a nuclear import receptor for SR proteins. *J Cell Biol* **145**, 1145-1152.
- Kent, O.A., Reayi, A., Foong, L., Chilibeck, K.A., und MacMillan, A.M.** (2003). Structuring of the 3' splice site by U2AF65. *J Biol Chem* **278**, 50572-50577.
- Keren, H., Lev-Maor, G., und Ast, G.** (2010). Alternative splicing and evolution: diversification, exon definition and function. *Nat Rev Genet* **11**, 345-355.
- Keshwani, M.M., Aubol, B.E., Fattet, L., Ma, C.T., Qiu, J., Jennings, P.A., Fu, X.D., und Adams, J.A.** (2015). Conserved proline-directed phosphorylation regulates SR protein conformation and splicing function. *Biochem J* **466**, 311-322.
- Kettenbach, A.N., Deng, L., Wu, Y., Baldissard, S., Adamo, M.E., Gerber, S.A., und Moseley, J.B.** (2015). Quantitative phosphoproteomics reveals pathways for coordination of cell growth and division by the conserved fission yeast kinase pom1. *Mol Cell Proteomics* **14**, 1275-1287.
- Kim, K.H., Cho, Y.M., Kang, W.H., Kim, J.H., Byun, K.H., Park, Y.D., Bae, K.S., und Park, H.M.** (2001). Negative regulation of filamentous growth and flocculation by Lkh1, a fission yeast LAMMER kinase homolog. *Biochem Biophys Res Commun* **289**, 1237-1242.
- Kohtz, J.D., Jamison, S.F., Will, C.L., Zuo, P., Lührmann, R., Garcia-Blanco, M.A., und Manley, J.L.** (1994). Protein-protein interactions and 5'-splice-site recognition in mammalian mRNA precursors. *Nature* **368**, 119-124.
- Konarska, M.M., und Sharp, P.A.** (1988). Association of U2, U4, U5, and U6 small nuclear ribonucleoproteins in a spliceosome-type complex in absence of precursor RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 5459-5462.
- Konarska, M.M., Vilardell, J., und Query, C.C.** (2006). Repositioning of the reaction intermediate within the catalytic center of the spliceosome. *Mol Cell* **21**, 543-553.
- Koonin, E.V.** (2009). Intron-dominated genomes of early ancestors of eukaryotes. *J Hered* **100**, 618-623.
- Kotzer-Nevo, H., de Lima Alves, F., Rappsilber, J., Sperling, J., und Sperling, R.** (2014). Supraspliceosomes at defined functional states portray the pre-assembled nature of the pre-mRNA processing machine in the cell nucleus. *Int J Mol Sci* **15**, 11637-11664.
- Kress, T.L., Krogan, N.J., und Guthrie, C.** (2008). A single SR-like protein, Npl3, promotes pre-mRNA splicing in budding yeast. *Mol Cell* **32**, 727-734.
- Ku, C., Nelson-Sathi, S., Roettger, M., Sousa, F.L., Lockhart, P.J., Bryant, D., Hazkani-Covo, E., McInerney, J.O., Landan, G., und Martin, W.F.** (2015). Endosymbiotic origin and differential loss of eukaryotic genes. *Nature* **524**, 427-432.
- Kuhn, A.N., und Käufer, N.F.** (2003). Pre-mRNA splicing in *Schizosaccharomyces pombe*: regulatory role of a kinase conserved from fission yeast to mammals. *Curr Genet* **42**, 241-251.
- Kunkel, T.A.** (1985). Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 488-492.
- Kupfer, D.M., Drabenstot, S.D., Buchanan, K.L., Lai, H., Zhu, H., Dyer, D.W., Roe, B.A., und Murphy, J.W.** (2004). Introns and splicing elements of five diverse fungi. *Eukaryot Cell* **3**, 1088-1100.
- Käufer, N.F., und Potashkin, J.** (2000). Analysis of the splicing machinery in fission yeast: a comparison with budding yeast and mammals. *Nucleic Acids Res* **28**, 3003-3010.
- Lee, Y., und Rio, D.C.** (2015). Mechanisms and Regulation of Alternative Pre-mRNA Splicing. *Annu Rev Biochem* **84**, 291-323.
- Leupold, U.** (1950). Die Vererbung von Homothallie und Heterothallie bei *Schizosaccharomyces pombe*. *C R Trav Lab Carlsberg, Ser Physiol* **24**, 381-480.
- Lindner, P.** (1893). *Schizosaccharomyces pombe* n. sp. neuer Gärungserreger. *Wochenschrift für Brauerei* **10**, 1298-1300.
- Lipp, J.J., Marvin, M.C., Shokat, K.M., und Guthrie, C.** (2015). SR protein kinases promote splicing of nonconsensus introns. *Nat Struct Mol Biol* **22**, 611-617.

- Liu, H.X., Zhang, M., und Krainer, A.R.** (1998). Identification of functional exonic splicing enhancer motifs recognized by individual SR proteins. *Genes Dev* **12**, 1998-2012.
- Liu, H.X., Chew, S.L., Cartegni, L., Zhang, M.Q., und Krainer, A.R.** (2000). Exonic splicing enhancer motif recognized by human SC35 under splicing conditions. *Mol Cell Biol* **20**, 1063-1071.
- Logsdon, J.M., Jr., Tyshenko, M.G., Dixon, C., J, D.J., Walker, V.K., und Palmer, J.D.** (1995). Seven newly discovered intron positions in the triose-phosphate isomerase gene: evidence for the introns-late theory. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 8507-8511.
- Lützelberger, M., und Käufer, N.F.** (2012). The Prp4 kinase: Its substrates, function and regulation in pre-mRNA splicing. In In Dr. Cai Huang (ed.), *Protein Phosphorylation in Human Health*. In Tech. (
- Lützelberger, M., Gross, T., und Käufer, N.F.** (1999). Srp2, an SR protein family member of fission yeast: in vivo characterization of its modular domains. *Nucleic Acids Res* **27**, 2618-2626.
- Lützelberger, M., Bottner, C.A., Schwelnus, W., Zock-Emmenthal, S., Razanau, A., und Käufer, N.F.** (2010). The N-terminus of Prp1 (Prp6/U5-102 K) is essential for spliceosome activation in vivo. *Nucleic Acids Res* **38**, 1610-1622.
- Ma, H., Kunes, S., Schatz, P.J., und Botstein, D.** (1987). Plasmid construction by homologous recombination in yeast. *Gene* **58**, 201-216.
- Maertens, G.N., Cook, N.J., Wang, W., Hare, S., Gupta, S.S., Oztop, I., Lee, K., Pye, V.E., Cosnefroy, O., Snijders, A.P., KewalRamani, V.N., Fassati, A., Engelman, A., und Cherepanov, P.** (2014). Structural basis for nuclear import of splicing factors by human Transportin 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 2728-2733.
- Manley, J.L., und Krainer, A.R.** (2010). A rational nomenclature for serine/arginine-rich protein splicing factors (SR proteins). In *Genes Dev* (United States), pp. 1073-1074.
- McManus, C.J., und Graveley, B.R.** (2011). RNA structure and the mechanisms of alternative splicing. *Curr Opin Genet Dev* **21**, 373-379.
- Misteli, T., Caceres, J.F., und Spector, D.L.** (1997). The dynamics of a pre-mRNA splicing factor in living cells. *Nature* **387**, 523-527.
- Misteli, T., Caceres, J.F., Clement, J.Q., Krainer, A.R., Wilkinson, M.F., und Spector, D.L.** (1998). Serine phosphorylation of SR proteins is required for their recruitment to sites of transcription in vivo. *J Cell Biol* **143**, 297-307.
- Moreno, S., Klar, A., und Nurse, P.** (1991). Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol* **194**, 795-823.
- Muro, A.F., Caputi, M., Pariyath, R., Pagani, F., Buratti, E., und Baralle, F.E.** (1999). Regulation of fibronectin EDA exon alternative splicing: possible role of RNA secondary structure for enhancer display. *Mol Cell Biol* **19**, 2657-2671.
- Neuvéglise, C., Marck, C., und Gaillardin, C.** (2011). The intronome of budding yeasts. *C R Biol* **334**, 662-670.
- Ngo, J.C., Chakrabarti, S., Ding, J.H., Velazquez-Dones, A., Nolen, B., Aubol, B.E., Adams, J.A., Fu, X.D., und Ghosh, G.** (2005). Interplay between SRPK and Clk/Sty kinases in phosphorylation of the splicing factor ASF/SF2 is regulated by a docking motif in ASF/SF2. *Mol Cell* **20**, 77-89.
- Nischt, R., Thuroff, E., und Käufer, N.F.** (1986). Molecular cloning of a ribosomal protein gene from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Genet* **10**, 365-370.
- Oldenburg, K.R., Vo, K.T., Michaelis, S., und Paddon, C.** (1997). Recombination-mediated PCR-directed plasmid construction in vivo in yeast. *Nucleic Acids Res* **25**, 451-452.
- Olsen, J.V., Vermeulen, M., Santamaria, A., Kumar, C., Miller, M.L., Jensen, L.J., Gnad, F., Cox, J., Jensen, T.S., Nigg, E.A., Brunak, S., und Mann, M.** (2010). Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis. *Sci Signal* **3**, ra3.
- Pan, Q., Shai, O., Lee, L.J., Frey, B.J., und Blencowe, B.J.** (2008). Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat Genet* **40**, 1413-1415.

- Pandit, S., Zhou, Y., Shiue, L., Coutinho-Mansfield, G., Li, H., Qiu, J., Huang, J., Yeo, G.W., Ares, M., Jr., und Fu, X.D.** (2013). Genome-wide analysis reveals SR protein cooperation and competition in regulated splicing. *Mol Cell* **50**, 223-235.
- Parker, R., Siliciano, P.G., und Guthrie, C.** (1987). Recognition of the TACTAAC box during mRNA splicing in yeast involves base pairing to the U2-like snRNA. *Cell* **49**, 229-239.
- Penny, D., Hoepfner, M.P., Poole, A.M., und Jeffares, D.C.** (2009). An overview of the introns-first theory. *J Mol Evol* **69**, 527-540.
- Plass, M., Agirre, E., Reyes, D., Camara, F., und Eyraes, E.** (2008). Co-evolution of the branch site and SR proteins in eukaryotes. *Trends Genet* **24**, 590-594.
- Raghunathan, P.L., und Guthrie, C.** (1998). RNA unwinding in U4/U6 snRNPs requires ATP hydrolysis and the DEIH-box splicing factor Brr2. *Curr Biol* **8**, 847-855.
- Ram, O., und Ast, G.** (2007). SR proteins: a foot on the exon before the transition from intron to exon definition. *Trends Genet* **23**, 5-7.
- Richert, K.** (2002). Untersuchungen zur Aufklärung des Prä-mRNA Spleißvorgangs in der Spalttheife *Schizosaccharomyces pombe*: Genetische und biochemische Charakterisierung der Interaktionen des *prp4* Gens. (Technische Universität Braunschweig).
- Rigbolt, K.T., Prokhorova, T.A., Akimov, V., Henningsen, J., Johansen, P.T., Kratchmarova, I., Kassem, M., Mann, M., Olsen, J.V., und Blagoev, B.** (2011). System-wide temporal characterization of the proteome and phosphoproteome of human embryonic stem cell differentiation. *Sci Signal* **4**, rs3.
- Rino, J., und Carmo-Fonseca, M.** (2009). The spliceosome: a self-organized macromolecular machine in the nucleus? *Trends Cell Biol* **19**, 375-384.
- Robberson, B.L., Cote, G.J., und Berget, S.M.** (1990). Exon definition may facilitate splice site selection in RNAs with multiple exons. *Mol Cell Biol* **10**, 84-94.
- Rogozin, I.B., Carmel, L., Csuros, M., und Koonin, E.V.** (2012). Origin and evolution of spliceosomal introns. *Biol Direct* **7**, 11.
- Rogozin, I.B., Wolf, Y.I., Sorokin, A.V., Mirkin, B.G., und Koonin, E.V.** (2003). Remarkable interkingdom conservation of intron positions and massive, lineage-specific intron loss and gain in eukaryotic evolution. *Curr Biol* **13**, 1512-1517.
- Rosenberg, G.H., Alahari, S.K., und Käufer, N.F.** (1991). *prp4* from *Schizosaccharomyces pombe*, a mutant deficient in pre-mRNA splicing isolated using genes containing artificial introns. *Mol Gen Genet* **226**, 305-309.
- Roy, S.W., und Irimia, M.** (2009). Splicing in the eukaryotic ancestor: form, function and dysfunction. *Trends Ecol Evol* **24**, 447-455.
- Sambrook, J., und Russell, D.W.** (2001). *Molecular Cloning - A Laboratory manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sanford, J.R., Wang, X., Mort, M., Vanduyne, N., Cooper, D.N., Mooney, S.D., Edenberg, H.J., und Liu, Y.** (2009). Splicing factor SFRS1 recognizes a functionally diverse landscape of RNA transcripts. *Genome Res* **19**, 381-394.
- Schaal, T.D., und Maniatis, T.** (1999). Selection and characterization of pre-mRNA splicing enhancers: identification of novel SR protein-specific enhancer sequences. *Mol Cell Biol* **19**, 1705-1719.
- Schneider, M., Will, C.L., Anokhina, M., Tazi, J., Urlaub, H., und Lührmann, R.** (2010a). Exon definition complexes contain the tri-snRNP and can be directly converted into B-like precatytic splicing complexes. *Mol Cell* **38**, 223-235.
- Schneider, M., Hsiao, H.H., Will, C.L., Giet, R., Urlaub, H., und Lührmann, R.** (2010b). Human PRP4 kinase is required for stable tri-snRNP association during spliceosomal B complex formation. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 216-221.
- Schwartz, S.H., Silva, J., Burstein, D., Pupko, T., Eyraes, E., und Ast, G.** (2008). Large-scale comparative analysis of splicing signals and their corresponding splicing factors in eukaryotes. *Genome Res* **18**, 88-103.

- Schwelnus, W., Richert, K., Opitz, F., Gross, T., Habara, Y., Tani, T., und Käufer, N.F.** (2001). Fission yeast Prp4p kinase regulates pre-mRNA splicing by phosphorylating a non-SR-splicing factor. *EMBO Rep* **2**, 35-41.
- Shaner, N.C., Lambert, G.G., Chammas, A., Ni, Y., Cranfill, P.J., Baird, M.A., Sell, B.R., Allen, J.R., Day, R.N., Israelsson, M., Davidson, M.W., und Wang, J.** (2013). A bright monomeric green fluorescent protein derived from *Branchiostoma lanceolatum*. *Nat Methods* **10**, 407-409.
- Shao, W., Kim, H.S., Cao, Y., Xu, Y.Z., und Query, C.C.** (2012). A U1-U2 snRNP interaction network during intron definition. *Mol Cell Biol* **32**, 470-478.
- Shen, H., und Green, M.R.** (2006). RS domains contact splicing signals and promote splicing by a common mechanism in yeast through humans. *Genes Dev* **20**, 1755-1765.
- Shepard, P.J., und Hertel, K.J.** (2008). Conserved RNA secondary structures promote alternative splicing. *Rna* **14**, 1463-1469.
- Siliciano, P.G., und Guthrie, C.** (1988). 5' splice site selection in yeast: genetic alterations in base-pairing with U1 reveal additional requirements. *Genes Dev* **2**, 1258-1267.
- Staknis, D., und Reed, R.** (1994). SR proteins promote the first specific recognition of Pre-mRNA and are present together with the U1 small nuclear ribonucleoprotein particle in a general splicing enhancer complex. *Mol Cell Biol* **14**, 7670-7682.
- Staley, J.P., und Guthrie, C.** (1998). Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs, and things. *Cell* **92**, 315-326.
- Stepankiw, N., Raghavan, M., Fogarty, E.A., Grimson, A., und Pleiss, J.A.** (2015). Widespread alternative and aberrant splicing revealed by lariat sequencing. *Nucleic Acids Res* **43**, 8488-8501.
- Stevens, S.W., Ryan, D.E., Ge, H.Y., Moore, R.E., Young, M.K., Lee, T.D., und Abelson, J.** (2002). Composition and functional characterization of the yeast spliceosomal penta-snRNP. *Mol Cell* **9**, 31-44.
- Swaffer, M.P., Jones, A.W., Flynn, H.R., Snijders, A.P., und Nurse, P.** (2018). Quantitative Phosphoproteomics Reveals the Signaling Dynamics of Cell-Cycle Kinases in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Rep* **24**, 503-514.
- Séraphin, B., Kretzner, L., und Rosbash, M.** (1988). A U1 snRNA:pre-mRNA base pairing interaction is required early in yeast spliceosome assembly but does not uniquely define the 5' cleavage site. *Embo j* **7**, 2533-2538.
- Takeuchi, M., und Yanagida, M.** (1993). A mitotic role for a novel fission yeast protein kinase dsk1 with cell cycle stage dependent phosphorylation and localization. *Mol Biol Cell* **4**, 247-260.
- Tang, Z., Yanagida, M., und Lin, R.J.** (1998). Fission yeast mitotic regulator Dsk1 is an SR protein-specific kinase. *J Biol Chem* **273**, 5963-5969.
- Tang, Z., Käufer, N.F., und Lin, R.J.** (2002). Interactions between two fission yeast serine/arginine-rich proteins and their modulation by phosphorylation. *Biochem J* **368**, 527-534.
- Tang, Z., Kuo, T., Shen, J., und Lin, R.J.** (2000). Biochemical and genetic conservation of fission yeast Dsk1 and human SR protein-specific kinase 1. *Mol Cell Biol* **20**, 816-824.
- Tang, Z., Mandel, L.L., Yean, S.L., Lin, C.X., Chen, T., Yanagida, M., und Lin, R.J.** (2003). The kic1 kinase of *Schizosaccharomyces pombe* is a CLK/STY orthologue that regulates cell-cell separation. *Exp Cell Res* **283**, 101-115.
- Tang, Z., Tsurumi, A., Alaei, S., Wilson, C., Chiu, C., Oya, J., und Ngo, B.** (2007). Dsk1p kinase phosphorylates SR proteins and regulates their cellular localization in fission yeast. *Biochem J* **405**, 21-30.
- Tang, Z., Luca, M., Portillio, J., Ngo, B., Chang, C., Wen, T., Murray, J., und Carr, A.** (2011). LAMMER kinase Kic1 is involved in pre-mRNA processing. *Exp Cell Res* **317**, 2308-2320.
- Tang, Z., Luca, M., Taggart-Murphy, L., Portillio, J., Chang, C., Guven, A., Lin, R.J., Murray, J., und Carr, A.** (2012). Interacting factors and cellular localization of SR protein-specific kinase Dsk1. *Exp Cell Res* **318**, 2071-2084.

- Tanida-Miyake, E., Koike, M., Uchiyama, Y., und Tanida, I.** (2018). Optimization of mNeonGreen for Homo sapiens increases its fluorescent intensity in mammalian cells. *PLoS One* **13**, e0191108.
- Tardiff, D.F., und Rosbash, M.** (2006). Arrested yeast splicing complexes indicate stepwise snRNP recruitment during in vivo spliceosome assembly. *Rna* **12**, 968-979.
- Varani, L., Hasegawa, M., Spillantini, M.G., Smith, M.J., Murrell, J.R., Ghetti, B., Klug, A., Goedert, M., und Varani, G.** (1999). Structure of tau exon 10 splicing regulatory element RNA and destabilization by mutations of frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 8229-8234.
- Wahl, M.C., Will, C.L., und Lührmann, R.** (2009). The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* **136**, 701-718.
- Wang, E.T., Sandberg, R., Luo, S., Khrebtkova, I., Zhang, L., Mayr, C., Kingsmore, S.F., Schroth, G.P., und Burge, C.B.** (2008). Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature* **456**, 470-476.
- Wang, Y., Xiao, X., Zhang, J., Choudhury, R., Robertson, A., Li, K., Ma, M., Burge, C.B., und Wang, Z.** (2013). A complex network of factors with overlapping affinities represses splicing through intronic elements. *Nat Struct Mol Biol* **20**, 36-45.
- Wang, Z., und Burge, C.B.** (2008). Splicing regulation: from a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. *Rna* **14**, 802-813.
- Warf, M.B., und Berglund, J.A.** (2010). Role of RNA structure in regulating pre-mRNA splicing. *Trends Biochem Sci* **35**, 169-178.
- Webb, C.J., und Wise, J.A.** (2004). The splicing factor U2AF small subunit is functionally conserved between fission yeast and humans. *Mol Cell Biol* **24**, 4229-4240.
- Webb, C.J., Romfo, C.M., van Heeckeren, W.J., und Wise, J.A.** (2005). Exonic splicing enhancers in fission yeast: functional conservation demonstrates an early evolutionary origin. *Genes Dev* **19**, 242-254.
- Will, C.L., und Lührmann, R.** (2011). Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**.
- Wilson-Grady, J.T., Villen, J., und Gygi, S.P.** (2008). Phosphoproteome analysis of fission yeast. *J Proteome Res* **7**, 1088-1097.
- Wong, M.S., Kinney, J.B., und Krainer, A.R.** (2018). Quantitative Activity Profile and Context Dependence of All Human 5' Splice Sites. *Mol Cell* **71**, 1012-1026.e1013.
- Wood, V., Rutherford, K.M., Ivens, A., Rajandream, M.A., und Barrell, B.** (2001). A re-annotation of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Comp Funct Genomics* **2**, 143-154.
- Wood, V., Harris, M., McDowall, M., Rutherford, K., Vaughan, B., Staines, D., Aslett, M., Lock, A., Bähler, J., Kersey, P., und Oliver, S.** (2012). PomBase: a comprehensive online resource for fission yeast. *Nucleic Acids Research* **40**:, D695-699.

- Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M.A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., Sgouros, J., Peat, N., Hayles, J., Baker, S., Basham, D., Bowman, S., Brooks, K., Brown, D., Brown, S., Chillingworth, T., Churcher, C., Collins, M., Connor, R., Cronin, A., Davis, P., Feltwell, T., Fraser, A., Gentles, S., Goble, A., Hamlin, N., Harris, D., Hidalgo, J., Hodgson, G., Holroyd, S., Hornsby, T., Howarth, S., Huckle, E.J., Hunt, S., Jagels, K., James, K., Jones, L., Jones, M., Leather, S., McDonald, S., McLean, J., Mooney, P., Moule, S., Mungall, K., Murphy, L., Niblett, D., Odell, C., Oliver, K., O'Neil, S., Pearson, D., Quail, M.A., Rabinowitsch, E., Rutherford, K., Rutter, S., Saunders, D., Seeger, K., Sharp, S., Skelton, J., Simmonds, M., Squares, R., Squares, S., Stevens, K., Taylor, K., Taylor, R.G., Tivey, A., Walsh, S., Warren, T., Whitehead, S., Woodward, J., Volckaert, G., Aert, R., Robben, J., Grymonprez, B., Weltjens, I., Vanstreels, E., Rieger, M., Schafer, M., Muller-Auer, S., Gabel, C., Fuchs, M., Dusterhoft, A., Fritz, C., Holzer, E., Moestl, D., Hilbert, H., Borzym, K., Langer, I., Beck, A., Lehrach, H., Reinhardt, R., Pohl, T.M., Eger, P., Zimmermann, W., Wedler, H., Wambutt, R., Purnelle, B., Goffeau, A., Cadieu, E., Dreano, S., Gloux, S., Lelaure, V., Mottier, S., Galibert, F., Aves, S.J., Xiang, Z., Hunt, C., Moore, K., Hurst, S.M., Lucas, M., Rochet, M., Gaillardin, C., Tallada, V.A., Garzon, A., Thode, G., Daga, R.R., Cruzado, L., Jimenez, J., Sanchez, M., del Rey, F., Benito, J., Dominguez, A., Revuelta, J.L., Moreno, S., Armstrong, J., Forsburg, S.L., Cerutti, L., Lowe, T., McCombie, W.R., Paulsen, I., Potashkin, J., Shpakovski, G.V., Ussery, D., Barrell, B.G., und Nurse, P. (2002). The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* **415**, 871-880.**
- Wu, J., und Manley, J.L. (1989).** Mammalian pre-mRNA branch site selection by U2 snRNP involves base pairing. *Genes Dev* **3**, 1553-1561.
- Wu, J.Y., und Maniatis, T. (1993).** Specific interactions between proteins implicated in splice site selection and regulated alternative splicing. *Cell* **75**, 1061-1070.
- Wu, S., Romfo, C.M., Nilsen, T.W., und Green, M.R. (1999).** Functional recognition of the 3' splice site AG by the splicing factor U2AF35. *Nature* **402**, 832-835.
- Xiao, S.H., und Manley, J.L. (1997).** Phosphorylation of the ASF/SF2 RS domain affects both protein-protein and protein-RNA interactions and is necessary for splicing. *Genes Dev* **11**, 334-344.
- Xie, J. (2014).** Differential evolution of signal-responsive RNA elements and upstream factors that control alternative splicing. *Cell Mol Life Sci* **71**, 4347-4360.
- Xu, Y.Z., und Query, C.C. (2007).** Competition between the ATPase Prp5 and branch region-U2 snRNA pairing modulates the fidelity of spliceosome assembly. *Mol Cell* **28**, 838-849.
- Yun, C.Y., Velazquez-Dones, A.L., Lyman, S.K., und Fu, X.D. (2003).** Phosphorylation-dependent and -independent nuclear import of RS domain-containing splicing factors and regulators. *J Biol Chem* **278**, 18050-18055.
- Zafrir, Z., und Tuller, T. (2015).** Nucleotide sequence composition adjacent to intronic splice sites improves splicing efficiency via its effect on pre-mRNA local folding in fungi. *Rna* **21**, 1704-1718.
- Zhou, H., Di Palma, S., Preisinger, C., Peng, M., Polat, A.N., Heck, A.J., und Mohammed, S. (2013).** Toward a comprehensive characterization of a human cancer cell phosphoproteome. *J Proteome Res* **12**, 260-271.
- Zhou, Z., und Fu, X.D. (2013).** Regulation of splicing by SR proteins and SR protein-specific kinases. *Chromosoma* **122**, 191-207.
- Zhuang, Y., und Weiner, A.M. (1986).** A compensatory base change in U1 snRNA suppresses a 5' splice site mutation. *Cell* **46**, 827-835.
- Zuo, P., und Maniatis, T. (1996).** The splicing factor U2AF35 mediates critical protein-protein interactions in constitutive and enhancer-dependent splicing. *Genes Dev* **10**, 1356-1368.

VI Anhang

1 Rohdaten zu den Ergebnissen der RIP

Tabelle 23| Rohdaten zu den Ergebnissen der RIP für das intronlose Gen *his5*

In Abbildung 9 sind die Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben. Signifikanz * = $p \leq 0.05$, ** = $p \leq 0.01$ und *** = $p \leq 0.001$.

Protein	% Input	Mittelwert	Standardabweichung	Signifikanz zur Pol II
U1-70K-HA	0,089	0,096	0,012	0,0006 ***
	0,11			
	0,088			
HA-U1A	0,119	0,137	0,016	0,0035 **
	0,144			
	0,148			
U1C-HA	0,123	0,130	0,006	0,0027 **
	0,135			
	0,133			
U1H-HA	0,105	0,106	0,003	0,0042 **
	0,103			
	0,109			
HA-Bpb1	0,132	0,133	0,006	0,0027 **
	0,14			
	0,128			
Uaf2-HA	0,153	0,165	0,013	0,0088 **
	0,164			
	0,178			
Lea1-TAP	0,093	0,089	0,017	0,0022 **
	0,104			
	0,071			
Msl1-HA	0,138	0,121	0,016	0,0094 **
	0,118			
	0,107			
Brr2-HA	0,134	0,119	0,013	0,0093 **
	0,112			
	0,11			
Pol II-HA	0,279	0,294	0,019	-
	0,316			
	0,288			
WT	0,073	0,072	0,005	0,0009 ***
	0,076			
	0,067			

Tabelle 24| Rohdaten zu den Ergebnissen der RIP für das Gen *dbp2*

In Abbildung 10 sind die Mittelwerte, Standardabweichungen und die Signifikanz zwischen dem vorderen und dem hinteren Bereich angegeben. MW, Mittelwert; Stabw, Standardabweichung; Signifikanz * = $p \leq 0.05$, ** = $p \leq 0.01$ und *** = $p \leq 0.001$. Signifikanz zum WT: v, vorne; h, hinten

Protein	Vorderer Bereich (% Input)	MW	Stabw	Hinterer Bereich (% Input)	MW	Stabw	Signifikanz vorne/hinten	Signifikanz zum WT
U1-70K-HA	0,380	0,387	0,023	0,242	0,252	0,018	0,0008 ***	v: 0,0032
	0,413			0,272				v:** h:***
	0,369			0,241				h: 0,0008
HA-U1A	0,412	0,432	0,018	0,280	0,318	0,033	0,0069 **	v: 0,0015
	0,445			0,336				v:** h:**
	0,439			0,339				h: 0,0063
U1C-HA	0,627	0,623	0,017	0,482	0,514	0,028	0,0330 *	v: 0,0006
	0,637			0,531				v:*** h:**
	0,604			0,529				h: 0,0014
U1H-HA	0,325	0,330	0,040	0,236	0,247	0,024	0,0171 *	v: 0,0111
	0,373			0,274				v:* h:**
	0,293			0,231				h: 0,0020
HA-Bpb1	0,488	0,515	0,024	0,609	0,635	0,027	0,0023 **	v: 0,0014
	0,525			0,635				v:** h:**
	0,532			0,662				h: 0,0011
Uaf2-HA	0,620	0,647	0,023	0,776	0,802	0,024	0,0013 **	v: 0,0008
	0,659			0,823				v:*** h:***
	0,661			0,806				h: 0,0003
Lea1-TAP	0,249	0,261	0,017	0,223	0,228	0,004	0,0609	v: 0,0061
	0,281			0,231				v:** h:**
	0,253			0,230				h: 0,0015
Msl1-HA	0,397	0,395	0,003	0,378	0,377	0,005	0,0539	v: 0,0003
	0,396			0,371				v:*** h:***
	0,391			0,381				h: 0,0009
Brr2-HA	0,244	0,247	0,021	0,263	0,232	0,029	0,4883	v: 0,0027
	0,228			0,206				v:** h:*
	0,270			0,227				h: 0,0147
Pol II-HA	0,516	0,484	0,038	0,469	0,475	0,025	0,7086	v: 0,0017
	0,442			0,454				v:** h:**
	0,493			0,503				h: 0,0025
WT	0,075	0,069	0,009	0,067	0,068	0,011	0,9340	-
	0,059			0,079				
	0,073			0,058				

Tabelle 25| Rohdaten zu den Ergebnissen der RIP für das Gen *srp54*

In Abbildung 10 sind die Mittelwerte, Standardabweichungen und die Signifikanz zwischen dem vorderen und dem hinteren Bereich angegeben. MW, Mittelwert; Stabw, Standardabweichung; Signifikanz * = $p \leq 0.05$, ** = $p \leq 0.01$ und *** = $p \leq 0.001$. Signifikanz zum WT: v, vorne; h, hinten

Protein	Vorderer Bereich (% Input)	MW	Stabw	Hinterer Bereich (% Input)	MW	Stabw	Signifikanz vorne/hinten	Signifikanz zum WT
U1-70K-HA	0,316	0,341	0,023	0,245	0,258	0,016	0,0051 **	v: 0,0014
	0,361			0,276				v:** h:**
	0,345			0,254				h: 0,0012
HA-U1A	0,305	0,334	0,029	0,201	0,216	0,014	0,0065 **	v: 0,0046
	0,333			0,220				v:** h:*
	0,364			0,228				h: 0,0104
U1C-HA	0,511	0,503	0,008	0,436	0,419	0,015	0,0047 **	v: 0,0005
	0,495			0,412				v:*** h:**
	0,504			0,409				h: 0,0014
U1H-HA	0,320	0,313	0,012	0,278	0,264	0,013	0,0345 *	v: 0,0028
	0,300			0,262				v:** h:**
	0,320			0,252				h: 0,0036
HA-Bpb1	0,283	0,298	0,008	0,315	0,320	0,007	0,0174 *	v: 0,0017
	0,279			0,328				v:** h:***
	0,267			0,317				h: 0,0004
Uaf2-HA	0,416	0,472	0,007	0,519	0,524	0,012	0,0088 **	v: 0,00004
	0,428			0,516				v:*** h:**
	0,416			0,538				h: 0,0011
Lea1-TAP	0,243	0,262	0,029	0,242	0,251	0,015	0,3102	v: 0,0063
	0,296			0,268				v:** h:***
	0,248			0,243				h: 0,0004
Msl1-HA	0,416	0,386	0,027	0,371	0,358	0,013	0,0764	v: 0,0050
	0,363			0,346				v: ** h:**
	0,380			0,356				h: 0,0027
Brr2-HA	0,379	0,393	0,019	0,352	0,401	0,044	0,6934	v: 0,0015
	0,386			0,414				v:** h:**
	0,414			0,437				h: 0,0082
Pol II-HA	0,583	0,573	0,019	0,602	0,573	0,026	0,9712	v: 0,0006
	0,585			0,553				v:*** h:**
	0,550			0,565				h: 0,0017
WT	0,096	0,104	0,008	0,103	0,106	0,013	0,6962	-
	0,112			0,120				
	0,103			0,095				

Tabelle 26 | Rohdaten zu den Ergebnissen der RIP für das Gen *prs5*

In Abbildung 10 sind die Mittelwerte, Standardabweichungen und die Signifikanz zwischen dem vorderen und dem hinteren Bereich angegeben. MW, Mittelwert; Stabw, Standardabweichung; Signifikanz * = $p \leq 0.05$, ** = $p \leq 0.01$ und *** = $p \leq 0.001$. Signifikanz zum WT: v, vorne; h, hinten

Protein	Vorderer Bereich (% Input)	MW	Stabw	Hinterer Bereich (% Input)	MW	Stabw	Signifikanz vorne/hinten	Signifikanz zum WT
U1-70K-HA	0,292	0,299	0,012	0,153	0,178	0,025	0,0051 **	v: 0,0001
	0,314			0,202				v:*** h:*
	0,293			0,179				h: 0,0241
HA-U1A	0,369	0,379	0,011	0,27	0,282	0,017	0,0134 *	v: 0,00005
	0,39			0,275				v:*** h:***
	0,378			0,302				h: 0,0003
U1C-HA	0,528	0,529	0,007	0,448	0,448	0,004	0,0007 ***	v: 0,00003
	0,537			0,452				v:*** h:**
	0,523			0,445				h: 0,0014
U1H-HA	0,317	0,32	0,007	0,245	0,248	0,007	0,0124 *	v: 0,0013
	0,314			0,256				v:** h:**
	0,328			0,242				h: 0,0077
HA-Bpb1	0,33	0,343	0,012	0,374	0,368	0,007	0,1503	v: 0,00019
	0,354			0,36				v:*** h:**
	0,344			0,369				h: 0,0023
Uaf2-HA	0,455	0,448	0,019	0,463	0,474	0,023	0,1033	v: 0,0019
	0,426			0,459				v:** h:***
	0,463			0,5				h: 0,0002
Lea1-TAP	0,178	0,187	0,011	0,156	0,173	0,017	0,0742	v: 0,0003
	0,2			0,189				v:*** h:*
	0,184			0,175				h: 0,0175
Msl1-HA	0,279	0,289	0,012	0,259	0,252	0,021	0,0746	v: 0,0021
	0,285			0,229				v:** h:**
	0,302			0,269				h: 0,0059
Brr2-HA	0,327	0,312	0,021	0,309	0,311	0,014	0,8899	v: 0,0058
	0,288			0,298				v:** h:**
	0,322			0,326				h: 0,0013
Pol II-HA	0,505	0,498	0,013	0,511	0,527	0,016	0,1356	v: 0,0003
	0,507			0,542				v:*** h:***
	0,483			0,529				h: 0,0007
WT	0,081	0,087	0,009	0,064	0,083	0,021	0,7814	-
	0,097			0,078				
	0,083			0,106				

2 Im Kinaseassay wurde das jeweilige mögliche Substrat mit der Kinase im Verhältnis 2.5 zu 1 eingesetzt und der Film wurde anschließend für unterschiedliche Dauer auf dem Gel exponiert

In der Tabelle 27 sind die unterschiedlichen getesteten Substrate mit ihrer molekularen Größe (Wood et al., 2012) angegeben. Außerdem sind die eingesetzten Stoffmengen, die gemessenen Konzentrationen nach der Proteinaufreinigung, sowie die eingesetzte Anzahl an μL im Kinaseassay und die Expositionszeit des Films angegeben. Die erfolgreichen Aufreinigungen der einzelnen Proteine sind in Abbildung 50 und Abbildung 51 zu finden.

Tabelle 27| Eigenschaften und Bedingungen der eingesetzten Proteine im Kinaseassay

Für den Fall, dass die aufgereinigte Menge an Substrat unter der eingesetzte errechnete Stoffmenge lag, das Protein degradiert oder die Aufreinigung verunreinigt war, wurde das potentielle maximale Volumen für den Ansatz eingesetzt (Im Kinaseassay mit Prp4 und Dsk1 lag das maximale Volumen bei 14,8 μL und mit Lkh1 bei 12,8 μL).

Proteinname	Molekulare Größe [kDa]	Eingesetzte Stoffmenge [pmol]	Konzentration [$\mu\text{g}/\mu\text{L}$]	Eingesetzte μL im Assay	Expositionszeit Film		
					Prp4	Dsk1	Lkh1
Prp4	55,22	15,14 ($\pm 0,84 \mu\text{g}$)	0,836	1	4 Std.	-	-
Dsk1	61,06	15,14 ($\pm 0,93 \mu\text{g}$)	0,932	1	-	5 Min.	-
Lkh1	77,49	15,14 ($\pm 1,17 \mu\text{g}$)	0,390	3	-	-	30 Min.
U1-70K	30,20	37,85 ($\pm 1,14 \mu\text{g}$)	0,402	2,84	2 Std.	5 Min.	30 Min.
U1A	28,34	37,85 ($\pm 1,07 \mu\text{g}$)	0,534	2,01	2 Std.	5 Min.	45 Min.
U1C	20,48	37,85 ($\pm 0,78 \mu\text{g}$)	0,066	14,8 / 12,8	2 Std.	5 Min.	45 Min.
U1H	81,04	37,85 ($\pm 3,07 \mu\text{g}$)	0,632	4,85	4 Std.	30 Min.	1 Std.
Bpb1	63,62	37,85 ($\pm 2,41 \mu\text{g}$)	0,300	8,03	6 Std.	30 Min.	30 Min.
Prp2	58,93	37,85 ($\pm 2,23 \mu\text{g}$)	0,153	14,8 / 12,8	4 Std.	15 Min.	1 Std.
Uaf2	25,03	37,85 ($\pm 0,95 \mu\text{g}$)	0,060	14,8 / 12,8	2 Std.	5 Min.	45 Min.
Srp2	42,57	37,85 ($\pm 1,61 \mu\text{g}$)	0,447	3,61	4 Std.	2 Min.	10 Min.
Srp1	31,07	37,85 ($\pm 1,18 \mu\text{g}$)	0,102	11,52	4 Std.	5 Min.	2 Std.
Rsd1	69,36	37,85 ($\pm 2,63 \mu\text{g}$)	0,496	5,29	1 Std.	2 Min.	10 Min.

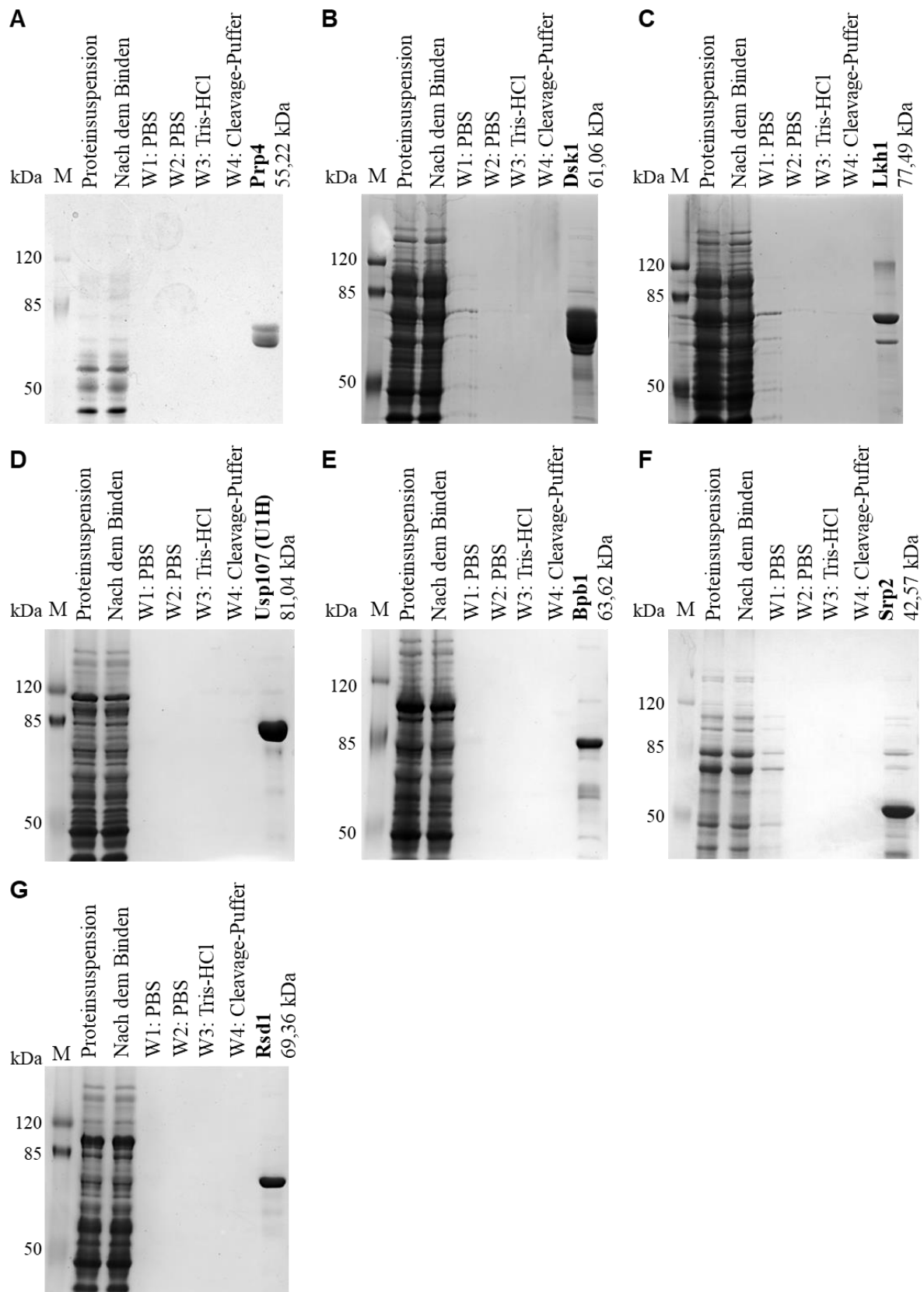


Abbildung 50| Die erfolgreiche Aufreinigung der drei Kinasen (A) Prp4, (B) Dsk1 und (C) Lkh1, und der im Kinaseassay getesteten Proteine (D) U1H, (E) Bpb1, (F) Srp2 und (G) Rsd1.

Die einzelnen Fraktionen der Proteinaufreinigung wurden in einem 8 %igem SDS-Gel aufgetrennt. Es wurden jeweils 20 µL der jeweiligen Fraktionen aufgetragen. M, Größenstandard; Links: Größenangaben des Standards in kDa.

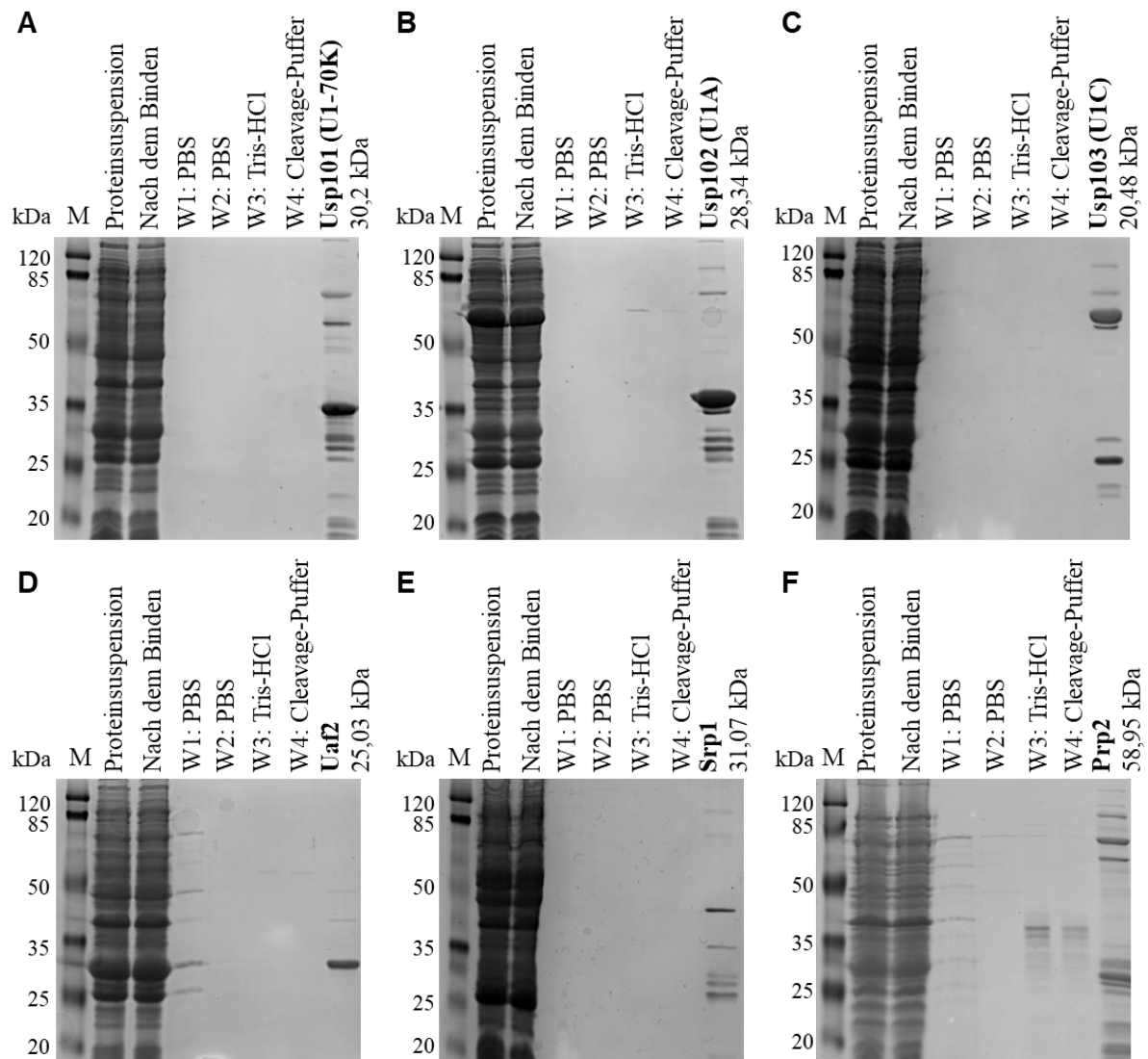


Abbildung 51| Die erfolgreiche Aufreinigung der im Kinaseassay getesteten Proteine (A) U1-70K, (B) U1A und (C) U1C, (D) Uaf2, (E) Srp1 und (F) Prp2.

Die einzelnen Fraktionen der Proteinaufreinigung wurden in einem 12 %igem SDS-Gel aufgetrennt. Es wurden jeweils 20 µL der jeweiligen Fraktionen aufgetragen. M, Größenstandard; Links: Größenangaben des Standards in kDa.

3 Die veränderte Transkriptionsrate des Gens *srp2* durch den *nmt81* Promotor hat weder einen Einfluss auf die Wachstumsrate noch auf die Prp4-Abhängigkeit

Die Stämme, 1045 (rot) und 1059 (blau), zeigen ohne Thiaminzugabe ebenfalls das gleiche Wachstumsverhalten wie der Kontrollstamm 801 und eine Teilung findet in etwa 2,5 Std. statt. Sie zeigen außerdem die typische Arretierung der Zellen für drei Stunden nach Zugabe von Inhibitor und setzen mit der Teilung nach den drei Stunden fort (Abbildung 52). In Bezug auf das Spleißverhalten zeigen die Stämme ohne Thiaminzugabe das gleiche Spleiß-Inhibitionsmuster wie die entsprechenden Kontrollstämme. Die veränderte Transkriptionsrate des Gens *srp2* durch den *nmt81* Promotor hat somit keinen Einfluss auf die Prp4-abhängigen (Abbildung 53) sowie Prp4-unabhängigen Introns (Abbildung 54).

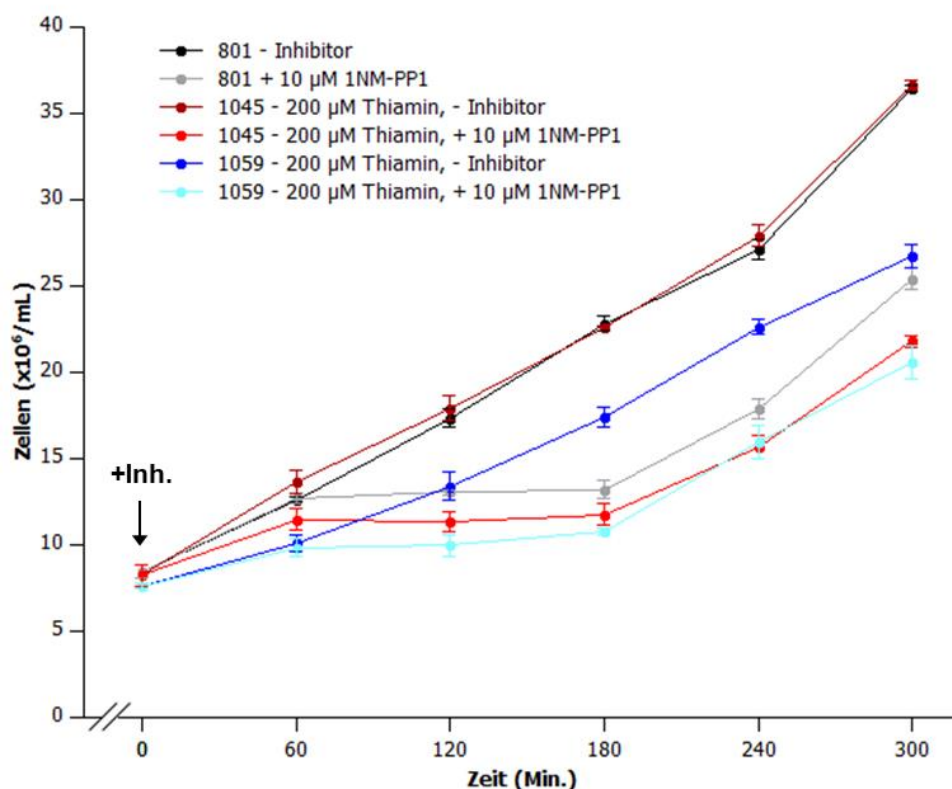


Abbildung 52| Die veränderte Transkriptionsrate des Gens *srp2* durch den *nmt81* Promotor hat keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Zellen

Das Wachstum der Stämme 801 (*prp4::int::prp4-as2-kan^R*) sowie 1045 (*prp4::int::prp4-as2-kan^R srp2::int::his7 leu1-32::int::pJKnmt81-srp2*) und 1059 (*prp4::int::prp4-as2-kan^R srp1::int::ura4 srp2::int::his7 leu1-32::int::pJKnmt81-srp2*) wurde ohne und mit Zugabe von 10 µM des Inhibitors 1NM-PP1 untersucht. Als Kontrolle wurde der Stamm 801 betrachtet. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Inhibitorzugabe (+Inh.).

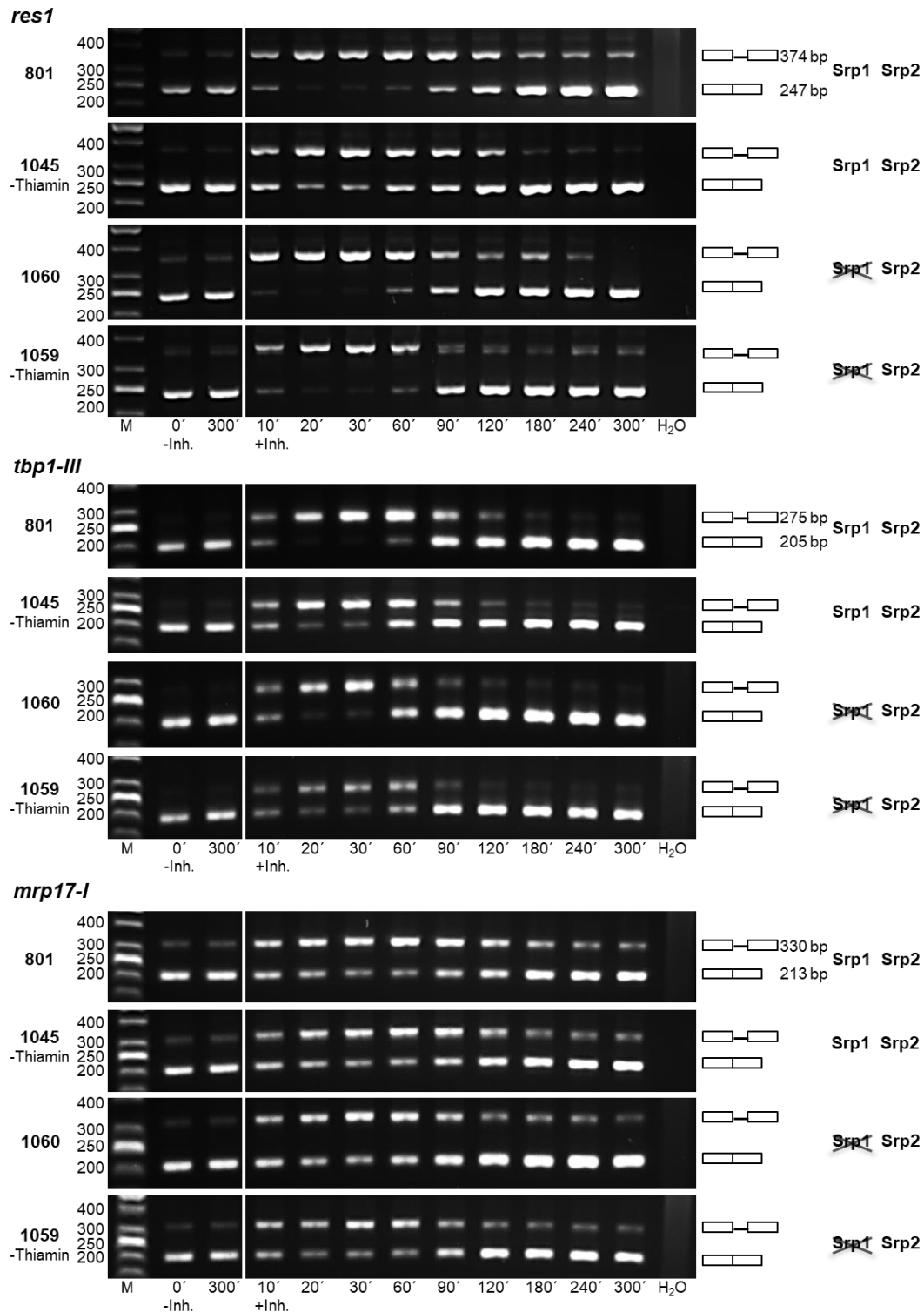


Abbildung 53| Die RT-PCR Analyse zeigt bei den Prp4-abhängigen Introns von *res1*, *tbp1-III* und *mrp17-I*, dass der aktive *nmt81* Promotor und somit die veränderte Transkriptionsrate des Gens *srp2* keinen Einfluss auf die Prp4-Abhängigkeit hat.

Ohne Zugabe von Inhibitor (0', 300', -Inh.) wird bei allen drei Genen hauptsächlich mRNA amplifiziert. Während bei dem Stamm 801 und 1045 (ohne Thiaminzugabe) von 10' bis 90' nach Zugabe von Inhibitor (+Inh.) bei allen drei Genen überwiegend prä-mRNA detektiert wird, ist bei den Stämmen 1060 und 1059 (ohne Thiaminzugabe) die Dauer der Akkumulation von prä-mRNA nach Inhibitorzugabe bei allen drei Introns beeinflusst. M, Größenstandard; Rechts: schematische Darstellung von prä-mRNA sowie mRNA mit den zu erwartenden Fragmentgrößen und die An- bzw. Abwesenheit der SR Proteine. Links: Stammnummern und Größenangaben des Standards; H₂O, Kontrollreaktion ohne RNA als Template. Bei Genen mit mehreren Introns werden die Introns mit römischen Zahlen nummeriert.

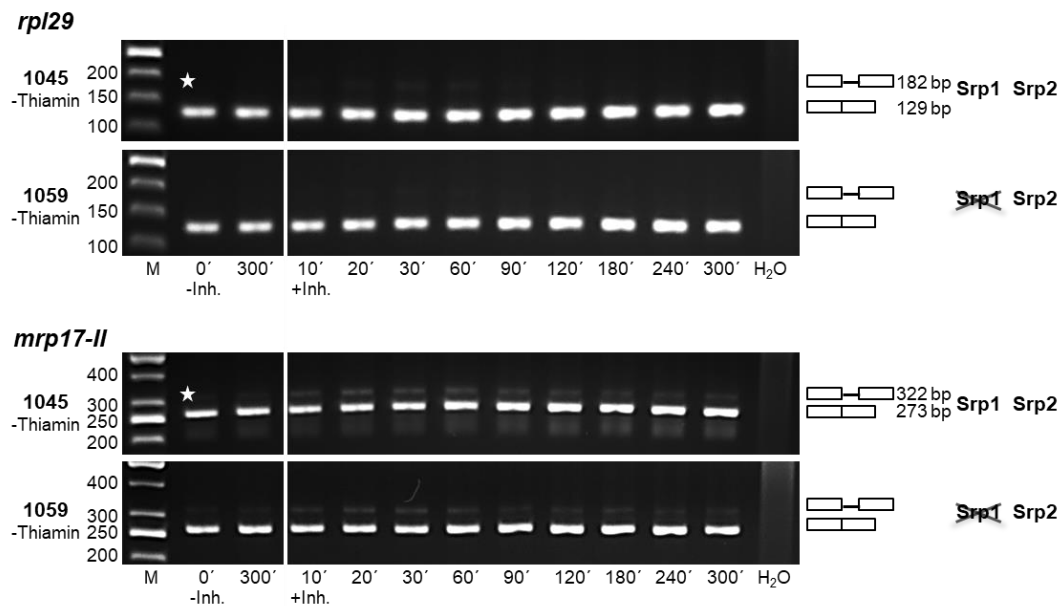


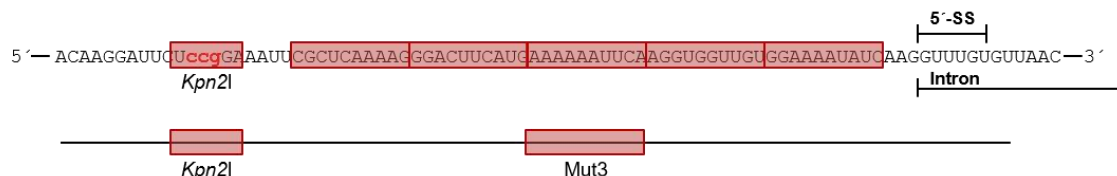
Abbildung 54| Die RT-PCR Analyse zeigt bei den Prp4-unabhängigen Introns von *rpl29* und *mrp17-II*, dass der aktive *nmt81* Promotor und somit die veränderte Transkriptionsrate des Gens *srp2* keinen Einfluss auf die Prp4-Unabhängigkeit hat.

Sowohl ohne Zugabe von Inhibitor (0', 300', -Inh.) als auch nach Zugabe von Inhibitor (+Inh.) wird bei allen Genen hauptsächlich mRNA amplifiziert. Es findet bei keinem der untersuchten Stämme eine Akkumulation von prä-mRNA statt. *, markiert die Position des zu erwartenden prä-mRNA Fragments; M, Größenstandard; Rechts: schematische Darstellung von prä-mRNA sowie mRNA mit den zu erwartenden Fragmentgrößen und die An- bzw. Abwesenheit der SR Proteine. Links: Stammnummern und Größenangaben des Standards; H₂O, Kontrollreaktion ohne RNA als Template. Bei Genen mit mehreren Introns werden die Introns mit römischen Zahlen nummeriert.

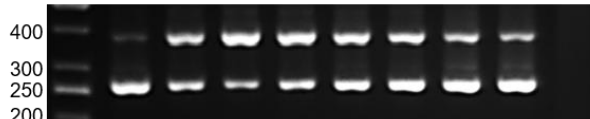
4 Mutationen in den Bereichen Mut3, Mut4 und Mut5 des Prp4-abhängigen *resI'*-Reportergens haben keinen Einfluss auf die Prp4-Abhängigkeit

Alle Allele zeigen in der RT-PCR das typische Prp4-abhängige Spleiß-Inhibitionsmuster. Ohne Inhibition der Kinase wird das Intron effizient gespleißt. Alle Allele akkumulieren 10 Min. nach Inhibition von Prp4 prä-mRNA und das Spleißen beginnt nach 90 Min. erneut (Abbildung 55 + Abbildung 56 + Abbildung 57).

A

res1^{-WT.K}*res1*^{-WT.K}

GUC | CAUΨCA
|| || ||
AAG | GUUUGU

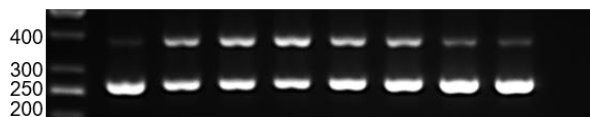


400 bp
273 bp
A A A A A U U C A
-33-32-31-30-29-28-27-26-25-24

B

res1^{-Mut3C.K}

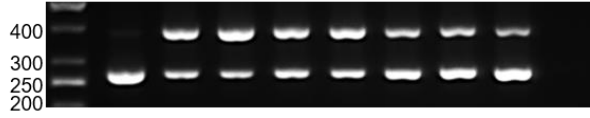
GUC | CAUΨCA
|| || ||
AAG | GUUUGU



400 bp
273 bp
c c c c c c c c C c
-33-32-31-30-29-28-27-26-25-24

res1^{-Mut3U.K}

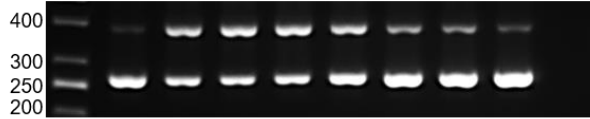
GUC | CAUΨCA
|| || ||
AAG | GUUUGU



400 bp
273 bp
u u u u u u U U u u
-33-32-31-30-29-28-27-26-25-24

res1^{-Mut3A.K}

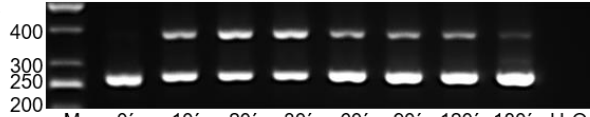
GUC | CAUΨCA
|| || ||
AAG | GUUUGU



400 bp
273 bp
A A A A A a a a A
-33-32-31-30-29-28-27-26-25-24

res1^{-Mut3G.K}

GUC | CAUΨCA
|| || ||
AAG | GUUUGU

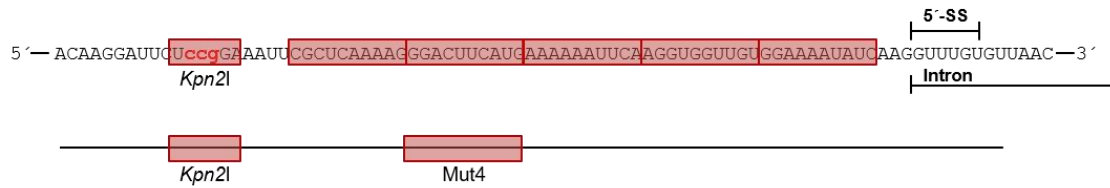


400 bp
273 bp
g g g g g g g g g
-33-32-31-30-29-28-27-26-25-24

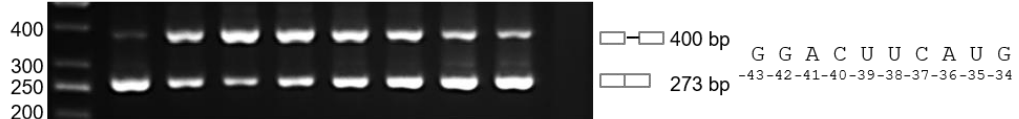
Abbildung 55| Mutationen in dem Bereich Mut3 beeinflussen nicht die Prp4-Abhängigkeit des Prp4-abhängigen *res1*⁻Reportergens

(A) Schematische Darstellung des zu mutierenden Bereichs Mut3 und die RT-PCR des Prp4-abhängigen Wildtyp-Allels *res1*^{-WT.K}. (B) Gezeigt ist die RT-PCR der gesetzten Mutationen in Bereich Mut3. Dabei wurden alle Nukleotide in diesem Bereich in Cs, Us, As oder Gs mutiert. Die RT-PCR zeigt, dass die Mutationen in diesem Bereich die Prp4 Kinase-Abhängigkeit nicht beeinflussen und das Intron wird weiterhin nach Inhibition der Kinase (+Inh.) Prp4-abhängig gespleißt (*res1*^{-Mut3C.K} + *res1*^{-Mut3U.K} + *res1*^{-Mut3A.K} + *res1*^{-Mut3G.K}). M, Größenstandard; H₂O, Kontrollreaktion ohne RNA als Template; Rechts: schematische Darstellung von prä-mRNA sowie mRNA und die gesetzten Mutationen. Mutierte Basen sind dick gedruckt, rot und mit kleinen Buchstaben hervorgehoben. Die Positionen sind angegeben. Links: Größenangaben des Standards und schematische Darstellung der Basenpaarung der U1 snRNA und Exon1/5'-SS; Ψ, Pseudouridin; |, Watson-Crick Basenpaarung.

A

res1^{-WT.K}*res1*^{-WT.K}

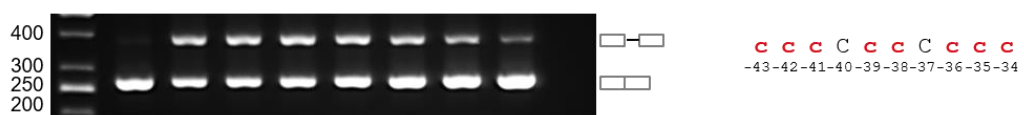
GUC | CAUΨCA
|| || ||
AAG | GUUUGU



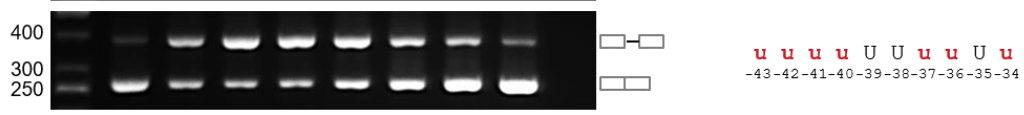
B

res1^{-Mut4C.K}

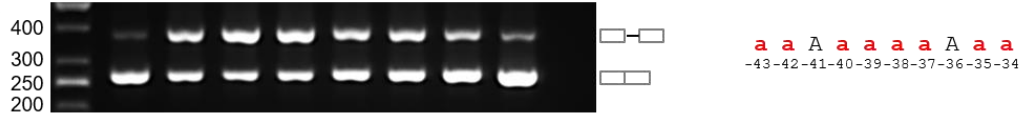
GUC | CAUΨCA
|| || ||
AAG | GUUUGU

*res1*^{-Mut4U.K}

GUC | CAUΨCA
|| || ||
AAG | GUUUGU

*res1*^{-Mut4A.K}

GUC | CAUΨCA
|| || ||
AAG | GUUUGU

*res1*^{-Mut4G.K}

GUC | CAUΨCA
|| || ||
AAG | GUUUGU

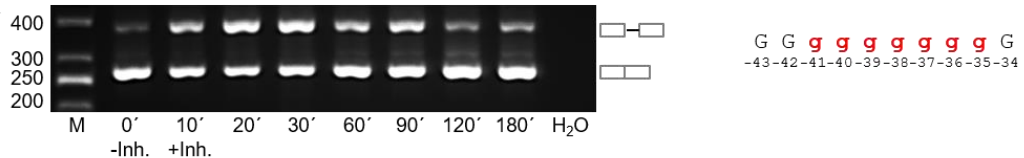
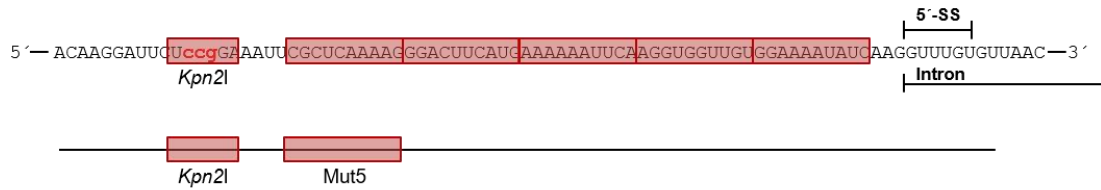


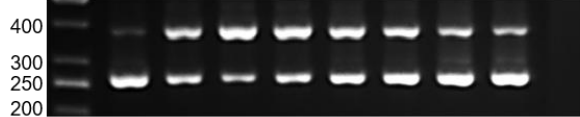
Abbildung 56| Mutationen in dem Bereich Mut4 haben keinen Einfluss auf die Prp4-Abhängigkeit des Prp4-abhängigen *res1*^{-Reporter}gens

(A) Schematische Darstellung des zu mutierenden Bereichs Mut4 und die RT-PCR des Prp4-abhängigen Wildtyp-Allels *res1*^{-WT.K}. (B) Gezeigt ist die RT-PCR der gesetzten Mutationen in Bereich Mut4. Dabei wurden alle Nukleotide in diesem Bereich in Cs, Us, As oder Gs mutiert. Die RT-PCR zeigt, dass die Mutationen in diesem Bereich die Prp4 Kinase-Abhängigkeit nicht beeinflussen und das Intron wird weiterhin nach Inhibition der Kinase (+Inh.) Prp4-abhängig gespleißt (*res1*^{-Mut4C.K} + *res1*^{-Mut4U.K} + *res1*^{-Mut4A.K} + *res1*^{-Mut4G.K}). M, Größenstandard; H₂O, Kontrollreaktion ohne RNA als Template; Rechts: schematische Darstellung von prä-mRNA sowie mRNA und die gesetzten Mutationen. Mutierte Basen sind dick gedruckt, rot und mit kleinen Buchstaben hervorgehoben. Die Positionen sind angegeben. Links: Größenangaben des Standards und schematische Darstellung der Basenpaarung der U1 snRNA und Exon1/5'-SS; Ψ, Pseudouridin; |, Watson-Crick Basenpaarung.

A

res1^{-WT.K}*res1*^{-WT.K}

GUC | CAUΨCA
 || || ||
 AAG | GUUUGU

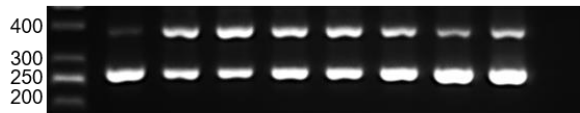


400 bp
 273 bp
 C G C U C A A A A G
 -53-52-51-50-49-48-47-46-45-44

B

res1^{-Mut5C.K}

GUC | CAUΨCA
 || || ||
 AAG | GUUUGU



C C C C C C C C C
 -53-52-51-50-49-48-47-46-45-44

res1^{-Mut5U.K}

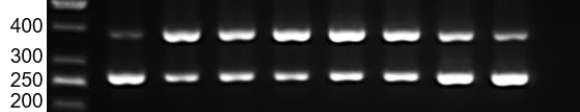
GUC | CAUΨCA
 || || ||
 AAG | GUUUGU



U U U U U U U U U
 -53-52-51-50-49-48-47-46-45-44

res1^{-Mut5A.K}

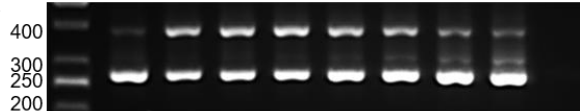
GUC | CAUΨCA
 || || ||
 AAG | GUUUGU



A A A A A A A A A
 -53-52-51-50-49-48-47-46-45-44

res1^{-Mut5G.K}

GUC | CAUΨCA
 || || ||
 AAG | GUUUGU



G G G G G G G G G
 -53-52-51-50-49-48-47-46-45-44

Abbildung 57| Mutationen in dem Bereich Mut5 zeigen keinen Einfluss auf die Prp4-Abhängigkeit des Prp4-abhängigen *res1*⁻-Reportergens

(A) Schematische Darstellung des zu mutierenden Bereichs Mut5 und die RT-PCR des Prp4-abhängigen Wildtyp-Allels *res1*^{-WT.K}. (B) Gezeigt ist die RT-PCR der gesetzten Mutationen in Bereich Mut5. Dabei wurden alle Nukleotide in diesem Bereich in Cs, Us, As oder Gs mutiert. Die RT-PCR zeigt, dass die Mutationen in diesem Bereich die Prp4 Kinase-Abhängigkeit nicht beeinflussen und das Intron wird weiterhin nach Inhibition der Kinase (+Inh.) Prp4-abhängig gespleißt (*res1*^{-Mut5C.K} + *res1*^{-Mut5U.K} + *res1*^{-Mut5A.K} + *res1*^{-Mut5G.K}). M, Größenstandard; H₂O, Kontrollreaktion ohne RNA als Template; Rechts: schematische Darstellung von prä-mRNA sowie mRNA und die gesetzten Mutationen. Mutierte Basen sind dick gedruckt, rot und mit kleinen Buchstaben hervorgehoben. Die Positionen sind angegeben. Links: Größenangaben des Standards und schematische Darstellung der Basenpaarung der U1 snRNA und Exon1/5'-SS; Ψ, Pseudouridin; |, Watson-Crick Basenpaarung.

Abkürzungsverzeichnis

γ [^{32}P] ATP	radioaktiv-markiertes ATP
Ψ	Pseudouridin
1NM-PP1	ATP-analoger Inhibitor
3'-SS	3'-Spleißstelle
5'-SS	5'-Spleißstelle
A	Adenosin
as	analog-sensitiv
AS	alternatives Spleißen
ATP	Adenosin-Tri-Phosphat
bidest.	bidestilliert
BP	Verzweigungspunkt (engl. <i>branch point</i>)
bp	Basenpaare
BS	Verzweigungssequenz (engl. <i>branch sequence</i>)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytidin
cDNA	<i>complementary</i> DNA
CLK	<i>cdc2-like kinases</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindole
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-Tri-Phosphat
DYRK	<i>dual specificity tyrosine-regulated kinases</i>
engl.	Englisch
ESE	<i>Exonic Splicing Enhancer</i>
ESS	<i>Exonic Splicing Silencer</i>
G	Guanosin
GST	Glutathione S-Transferase
hnRNP	<i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein</i>
hs	<i>Homo sapiens</i>
Inh.	Inhibitor
IP	Immunopräzipitation (präzipitierte RNA)
ISE	<i>Intronic Splicing Enhancer</i>
ISS	<i>Intronic Splicing Silencer</i>
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
M	Größenstandard (engl. <i>marker</i>)

MCS	Polylinker (engl. <i>multiple cloning site</i>)
Min.	Minute
mNG	mNeonGreen
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
nt	Nukleotid
NTC	<i>NineTeen Complex</i>
Pol	Polymerase
prp	<i>pre-mRNA processing</i>
Prp4	<i>pre-mRNA processing protein 4 kinase</i>
Prp4 _{as2}	analog-sensitive Prp4 Kinase
RIP	RNA-Immunopräzipitation
RNA	Ribonukleinsäure
RNA-Seq	RNA-Sequenzierung
RNP-1/-2	<i>ribonucleoprotein consensus sequence</i> ; RNP-CS
RSEI	<i>Relative Splicing Efficiency Index</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>Reverse Transkription Polymerase Chain Reaction</i>
qRT-PCR	<i>quantitative Reverse Transkription Polymerase Chain Reaction</i>
RRM	RNA-Erkennungsmotive (engl. <i>RNA recognition motif</i>)
sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
Sek.	Sekunde
snRNA	kleine Kern RNA (engl. <i>small nuclear RNA</i>)
snRNP	kleiner Kernribonukleoprotein Partikel (engl. <i>small nuclear ribonucleoprotein particle</i>)
sp	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
SR	Serin/Arginin-reich
SRE	<i>splicing regulatory elements</i>
SRPK	<i>serine-arginine protein kinases</i>
Std.	Stunde
T _m	Schmelztemperatur
U	Uridin
UpM	Umdrehungen pro Minute
WT	Wildtyp
YRC	<i>Yeast Recombinational Cloning</i>

Danksagung

Ein besonderer Dank geht an meinen Mentor Herrn Professor Dr. Norbert F. Käufer, der mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Doktorarbeit mit diesem interessanten und spannenden Thema anzufertigen. Vielen Dank für die große Unterstützung, die Ratschläge, die Diskussionen und der konstruktiven Kritik während der gesamten Zeit. Ebenfalls möchte ich mich für Möglichkeit der Teilnahme an nationalen und internationalen Konferenzen bedanken. Ich schätze sehr Ihre verständnisvolle Art gerade auch auf der persönlichen Ebene.

Bei Herrn Professor André Fleißner bedanke ich mich für die Übernahme des Korreferats und die hilfreichen Diskussionen und Anregungen zu dieser Arbeit in den gemeinsamen Arbeitsgruppen-Seminaren.

Herrn Professor Dr. Karsten Hiller danke ich für die freundliche Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Ich bedanke mich auch bei Herrn Professor Dr. José Ayté und bei Herrn Dr. Jared L. Johnson, die einen Teil der Ergebnisse dieser Arbeit produziert haben. Danke auch an Ute Nieländer und Miri, dass ich die FrenchPress eurer Arbeitsgruppen benutzen durfte. Ebenfalls ein Dankeschön an Frederik Sündermann für die Erstellung der Häufigkeitshistogramme.

Außerdem bedanke ich mich bei Susi und Dani. Es war wirklich eine schöne und lustige Zeit mit euch nicht nur im Labor, sondern auch privat. Vielen Dank für die wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Gespräche und Ratschläge und die unvergesslichen Ausflüge. Auch Ulrike danke ich dafür, dass du immer ein offenes Ohr für mich hattest. Danke auch an Konstantin für die Unterstützung und Diskussionen bezüglich meiner Arbeit bei einer Tasse Kaffee. Auch bei allen ehemaligen Studenten der Arbeitsgruppe Käufer bedanke ich mich. Danke an Nina, Sebastian, Laura, Ariane, Jan und Lena für die schöne Zeit mit euch.

Ich bedanke mich darüber hinaus bei dem gesamten Institut für Genetik für die gute und entspannte Atmosphäre im Institut und für die zahlreichen schönen Betriebsausflüge und Weihnachtsfeiern. Vielen Dank auch an Marion an Carsta des Sekretariats nicht nur für arbeitstechnische Angelegenheiten sondern auch für die netten und oft aufbauenden Gespräche mit euch.

Insbesondere bedanke ich mich auch bei meiner Familie und meinem Mann Hendrik. Danke dafür, dass ihr immer hinter mir steht, mich unterstützt und aufmunternde Worte findet. Hendrik dir danke ich außerdem dafür, dass du mich immer zum Lachen bringst und mich auf den Boden der Tatsachen zurückholst, wenn es nötig ist. Danke, dass du immer für mich da bist.